



Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας

Βιοδείκτες
της μη αλκοολικής λιπώδη νόσου του ήπατος

Διπλωματική Μελέτη
Λαγαρού Ευθυμία

ΥΠ. ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ : ΚΟΥΡΕΤΑΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ
ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ: ΔΕΔΟΥΣΗΣ ΓΕΩΡΓΙΟΣ
ΣΤΑΓΚΟΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ
ΚΟΥΡΕΤΑΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ

2014

~Ευχαριστίες~

“Αρχικά , πρέπει να ευχαριστήσω θερμά , τον καθηγητή μου, κύριο Κουρέτα Δημήτριο , που χωρίς την συμβολή του και την βοήθεια του δεν θα είχε πραγματοποιηθεί αυτή η μελέτη. Και προσμετρώντας την ιδιαιτερότητα της περίπτωσης μου , του οφείλω ακόμα ένα ευχαριστώ.

Ένα τεράστιο ευχαριστώ , στον κύριο Δεδούση Γεώργιο καθηγητή Μοριακής και Κυτταρικής Γενετικής του ανθρώπου στο Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο Αθηνών , που με δέχτηκε στο εργαστήριο του και από την πρώτη στιγμή με έκανε να νιώσω μέρος της ομάδας του. Ένα εργαστήριο που έχει στελεχωθεί από νέες γυναίκες επιστήμονες που κάνουν μια πολύ αξιόλογη δουλειά .

Τέλος δεν πρέπει να ξεχάσω να ευχαριστήσω , όλες τις υποψήφιες διδάκτορες , για την βοήθεια και την άψογη συνεργασία”

Λαγαρού Ευθυμία

Περιεχόμενα

Ενότητα Πρώτη/θεωρητικό μέρος

Περίληψη.....	4
ΚεφI/Εισαγωγή.....	6
Η μη αλκοολική λιπώδης νόσος του ήπατος.....	8
Κεφ2/Βιοδείκτες της μη αλκοολικής λιπώδη νόσου.....	14
Αξιολόγηση ενός βιοδείκτη.....	16
Ευρεση του ιδανικού βιοδείκτη.....	19
Το ήπαρ και οι λειτουργίες του.....	20
Η ενδοκρινής δράση του λιπώδη ιστού.....	22
Στοχευμένες μελέτες/μελέτες συσχέτισης.....	25
Τρανσαμινάσες και γGT.....	26
Λιποκυτταροκίνες και δείκτες φλεγμονής.....	29
Βιοδείκτες απόπτωσης.....	41
Βιοδείκτες οξειδωτικού στρές και ίνωσης.....	44
Βιοδείκτες απο μη στοχευμένες προσεγγίσεις.....	45
Αλγόριθμοι διάγνωσης.....	46

Ενότητα Δεύτερη/Πειραματικό μέρος

Σκοπός.....	49
Μεθοδολογία.....	49
Αποτελέσματα.....	58
Συζήτηση.....	66
Βιβλιογραφία.....	67

Περίληψη

Εισαγωγή : Η μη αλκοολική λιπώδης νόσος του ήπατος (NAFLD) είναι σήμερα μία από τις συχνότερες αιτίες χρόνιας ηπατοπάθειας παγκοσμίως. Περιλαμβάνει εύρος παθολογικών καταστάσεων από το απλό μη αλκοολικό λιπώδες ήπαρ (Non Alcoholic Fatty Liver-NAFL) έως την μη αλκοολική στεατοηπατίτιδα (Non Alcoholic Steatohepatitis-NASH), την ίνωση και την κίρρωση σε άτομα που δεν καταναλώνουν σημαντικές ποσότητες αλκοόλ. Η εμφάνιση της σχετίζεται με την παχυσαρκία και με τα άλλα επιμέρους χαρακτηριστικά του μεταβολικού συνδρόμου. Η διάγνωση της είναι δύσκολη, αφού στις περισσότερες των περιπτώσεων είναι ασυμπτωματική και η βιοψία ήπατος είναι η μόνη μέθοδος που διαφοροποιεί την ηπατική στεάτωση από την στεατοηπατίτιδα και κατηγοριοποιεί το μέγεθος της ίνωσης.

Οι έρευνες στρέφονται αυτήν την στιγμή στην εύρεση μη επεμβατικών μεθόδων που θα χρησιμεύσουν ως εναλλακτικές της βιοψίας. Για τον λόγο αυτό μελετούνται πλήθος βιοδεικτών που μεσολαβούν στην παθογένεια της, δηλαδή βιοδείκτες φλεγμονής, κυτταρικής απόπτωσης, κυτταροκίνες του λιπώδη ιστού κ.α

Σκοπός: Σκοπός αυτής της μελέτης είναι η ανάλυση των επιμέρους βιοδεικτών, ανάλυση των προσεγγίσεων για την ανακάλυψη τους, η εκτίμηση της αποτελεσματικότητάς τους και ο ρόλος που παίζει ο καθένας στην παθογένεια της νόσου. Στο πειραματικό μέρος αυτής της μελέτης, γίνεται σύγκριση των επιπέδων γνωστών βιοδεικτών της NAFLD σε άτομα με διαγνωσμένη λιπώδη διήθηση στο ήπαρ και σε υγιείς.

Μεθοδολογία: Για την διερεύνηση των επιπέδων των βιοδεικτών χρησιμοποιήσαμε ένα δείγμα ανθρώπων, που αποτελούνταν από 176 εθελοντές (88 με μη αλκοολική λιπώδη διήθηση και 88 χωρίς). Η διάγνωση και η σταδιοποίηση της νόσου (επίπεδα 1,2,3) έγινε με υπερηχογράφημα άνω κοιλίας. Πραγματοποιήθηκε αιμοληψία και εξάχθηκε πλάσμα, ορός και λευκά μέρος του οποίου φυλάχθηκε για μετέπειτα δοκιμασίες. Μετρήθηκαν τα επίπεδα ιντερλευκίνης 6, CRP, SGOT και SGPT, γ GT, TG κ.α

Αποτελέσματα: Άτομα με δείκτη μάζας σώματος πάνω από $\geq 30 \text{ Kg/m}^2$, έχουν πολύ μεγαλύτερη πιθανότητα να έχουν στεάτωση (λιπώδη διήθηση) στο ήπαρ ($p=0,001$). Επιπλέον ανακαλύψαμε ότι η αύξηση της ηλικίας είναι ευθέως ανάλογη της

αύξησης του βαθμού στεάτωσης ($p=0,044$).Κύριο χαρακτηριστικά των περισσότερων βιοχημικών αποτελεσμάτων είναι ότι τα άτομα με μη αλκοολική λιπώδη διήθηση στην πλειοψηφία τους έχουν εντός των φυσιολογικών τιμών δείκτες , αλλά τα επίπεδά τους είναι πάντα πιο αυξημένα από των υγιών.Την μεγαλύτερη διαφορά ανάμεσα σε υγιείς και ασθενείς , την λάβαμε στο επίπεδο **τριγλυκεριδίων $P<0,0001$** , της **SGPT $P=0,0001$** ,της **γ GT $P=0,0026$** και της **CRP $P=0,0252$** .Τα επίπεδα της IL 6 -αν και ο μέσος όρος ήταν μεγαλύτερος στους ασθενείς- βρέθηκαν υψηλά σε όλο το δείγμα.(τόσο σε ασθενείς όσο και σε υγιείς) Πράγμα που πρέπει να οφείλεται στον πολυπαραγοντικό ρόλο της λιποκυτταροκίνης αυτής .

Για το λόγο αυτό πιστεύουμε ότι η εκτίμηση των επιπέδων της IL 6 αλλά και άλλων βιοδεικτών όπως τα ηπατικά ένζυμα πρέπει να γίνεται σε συνδυασμό με άλλα κοινά χαρακτηριστικά της νόσου όπως το υψηλό BMI και τα τριγλυκερίδια .

Συμπεράσματα :Η κατανόηση της παθογένειας και των πολύπλοκων μηχανισμών που διέπουν την νόσο , ανοίγει νέους δρόμους για την μελέτη και ανεύρεση νέων βιοδεικτών .Αυτή την στιγμή διεξάγεται πλήθος μελετών , κάθε μία από διαφορετική σκοπιά , με άλλη στρατηγική προσέγγισης ,μελετώντας διαφορετικό προφίλ ασθενών και διαφορετικό στάδιο της νόσου .Η ετερογένεια αυτή των μεθόδων και των τεχνικών , αντικατοπτρίζει την ίδια την ετερογένεια της νόσου .Οι πρωτομικές και γονιδιωματικές μελέτες παρέχουν λύσεις στον γρίφο των μηχανισμών και της παθογένεσης και παρουσιάζουν πιθανούς στόχους για εύρεση μη επεμβατικών βιοδεικτών .Περισσότερη κλινική χρησιμότητα δείχνουν να έχουν οι βιοδείκτες που προέρχονται από μελέτες συσχέτισης αλλά και οι μελέτες με χρήση αλγόριθμων που αποτελούνται κυρίως από κλινικά εύκολα διαθέσιμους δείκτες, έχοντας έτσι την δυνατότητα να χρησιμοποιηθούν στην καθημερινή πρακτική .

Τα δυνητικά οφέλη της ανακάλυψης και επικύρωσης βιοδεικτών για τη NAFLD μοιάζουν να είναι πολλά συμπεριλαμβανομένης της αυξημένης ευκολίας στην διάγνωση, τον μειωμένο κίνδυνο και το μειωμένο κόστος, καθώς και τις γνώσεις που τελικά λαμβάνουμε χρησιμοποιώντας αυτές τις τεχνικές, για τους μηχανισμούς που διέπουν την παθογένεια της νόσου που μας είναι μέχρι στιγμής λίγο πολύ ακόμα άγνωστοι.

Abstract

Introduction : Non alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is one of the most common chronic liver diseases nowadays. It has a wide pathological profile, from simple steatosis (Non alcoholic fatty liver NAFL) to non alcoholic steatohepatitis (NASH) which can lead to fibrosis and cirrhosis in individuals who do not consume alcohol. NAFLD considered the hepatic manifestation of the metabolic syndrome and has been etiologically correlated with obesity and insulin resistance. The diagnosis of the disease is difficult because most of the cases haven't clinical features, making the Liver Biopsy the golden standard for detecting and evaluating the whole histopathological range of Nafld. Many studies carried out at the time to discover non invasive biomarkers that can be used to avoid the biopsy. For this reason researchers examined a variety of markers associated with its pathogeny (inflammatory biomarkers, marker of cell apoptosis, chemokines)

Purpose: The purpose of this study is to analyse the biomarkers of the disease, examine the different approaches for their discoveries and evaluate them. For this reason we ran a research in which we investigate the levels of known biomarkers of NAFLD in both patients and healthy individuals .

Methodology: We studied the levels of NAFLD biomarkers in a population of 176 people (88 with fatty liver and 88 without). The diagnosis of the disease made with ultrasound .(levels 0 , 1 , 2, 3) .We take blood samples- plasma , serum , blood cells and measure IL 6 , CRP ,hepatic enzymes , LDL HDL total cholesterol , FE and ferritin .

Results: We observed that people with BMI ≥ 30 Kg/m² have greater danger to having steatosis .(p=0,001) .Furthermore the level of steatosis is related with age .(p=0,044)The main characteristic of the people with fatty liver in the biochemical measurements is that they have bigger levels than the healthy .The most significant differences had taken in the levels of TG s P<0,0001 , SGPT P=0,0001 , gGT P=0,0026 and CRP P=0,0252 .IL 6 levels found great both healthy and diseased ,that may been caused by the wide role of the chemokine in the human body .For this reason we believe that IL 6 levels must been evaluated together with other characteristics of the disease such as BMI and TGs .

Conclusion: The understanding of the mechanisms that are associated with the pathogenesis of the disease , are opening novel fields in finding new biomarkers .Many studies are performed at this time , each using differing technics ,studying different patients profiles and different stage of the disease adding to the heterogeny of the field. The proteomics and genomics studies may provide answers to the mechanism and highlighting to potential non-invasive biomarkers .Biomarkers from target-association studies and these with the use of algorithms led themselves to more clinical utility ,because they are comprised mostly of routinely available clinical and biochemical markers and such have the potential to be used in every day practice .Discovering and validating novel biomarker of Nafld have several potential benefits , including increased ease of diagnosis , reduced of risk an costs as well as insights into diseases mechanisms and pathogenesis

Εισαγωγή

Η εξέλιξη του ανθρώπινου είδους , είχε ως επακόλουθο της , αλλαγές στον τρόπο ζωής. Νέες ασθένειες και σύνδρομα , είναι το κληροδότημα του ανθρώπου του 20^{ου} και 21^{ου} αιώνα στις επόμενες γενιές .Το μεταβολικό σύνδρομο , η παχυσαρκία , ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου 2 είναι ασθένειες που απασχολούν τον σύγχρονο άνθρωπο – αποτέλεσμα του σύγχρονου τρόπου ζωής .

Το ανθρώπινο σώμα , είναι μία σχεδόν τέλεια προγραμματισμένη μηχανή .Όλες οι λειτουργίες του , υπόκεινται σε πολύπλοκους ρυθμιστικούς μηχανισμούς που απαρτίζονται από αλληλένδετα μονοπάτια .

Τα τελευταία χρόνια με την πρόοδο της επιστήμης , με την ολοκλήρωση της χαρτογράφησης του ανθρώπινου γονιδιώματος και με την ανάπτυξη καλύτερων τεχνικών μελέτης και απομόνωσης πρωτεϊνών και νουκλεϊνικών οξέων και βεβαίως με την δημιουργία μιας πληθώρας βάσεων δεδομένων , άρχισε σιγά σιγά να λύνεται ο γρίφος .Οι ερευνητές , εργαζόμενοι σαν ντέντεκτιβς , χρησιμοποιώντας στοιχεία που υπήρχαν ήδη και συσχετίζοντας τα με νέα κατάφεραν να αποκωδικοποιήσουν αρκετούς μηχανισμούς και να ρίξουν φως σε σημαντικές βιολογικές διεργασίες που μέχρι τώρα μας ήταν άγνωστες. Κατανοώντας λοιπόν και αναλύοντας τις λειτουργίες αυτές , ανοίγει ο δρόμος για την διάγνωση και για την στοχευμένη θεραπεία ασθενειών .

Η μη αλκοολική λιπώδης νόσος του ήπατος(NAFLD) , είναι φανερά μία από τις ασθένειες που πηγάζει από τον σύγχρονο τρόπο ζωής .Αν και οι ακριβής διαδικασίες που μεσολαβούν στην εκδήλωση της δεν μας είναι πλήρως κατανοητές , είναι από όλους αποδεκτό ότι σχετίζεται στενά με την παχυσαρκία την αντίσταση στην ινσουλίνη και με όλες τις υπόλοιπες εκφάνσεις του μεταβολικού συνδρόμου .Η αύξηση της είναι ραγδαία , με έναν πολύ μεγάλο επιπολασμό στο ανεπτυγμένο κόσμο που φτάνει να ανέρχεται έως και το 30% του πληθυσμού στις στις χώρες με μεγάλα ποσοστά παχυσαρκίας .

Η νόσος φαίνεται να μην έχει ηλικία , μιας και μελέτες που έχουν γίνει σε παιδιά με αυξημένο βάρος αποκαλύπτουν την μεγάλη της διείσδυση.

Η Nafld είναι ιδιαίτερα επικίνδυνη για πολλούς λόγους .Οι σημαντικότεροι από αυτούς είναι ότι είναι σιωπηλή (τις περισσότερες φορές δεν έχει συμπτώματα) , πολυσταδιακή (ξεκινά από λιπώδη διήθηση που μπορεί να καταλήξει σε στεατοηπατίτιδα και ίνωση με κίνδυνο να εξελιχθεί σε κίρρωση ακόμα και ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα) και δύσκολη στην διάγνωση διότι εκτός από την λύση της βιοψίας δεν υπάρχει κάποιος 100% σίγουρος δείκτης διάγνωσης της ύπαρξης και της σοβαρότητας της .

Με γνώμονα την σοβαρότητα και την μεγάλη διείσδυση στον πληθυσμό αλλά και με κλειδί την αναγνώριση κάποιων από τους μηχανισμούς που μεσολαβούν για την δημιουργία της, ο επιστημονικός κόσμος έχει δείξει μεγάλο ενδιαφέρον για την

εύρεση μη επεμβατικών μεθόδων διάγνωσης της .

Οι μελέτες έχουν στραφεί στην χρήση βιοδεικτών που θα μπορούν με ασφάλεια να διαγνώσουν την νόσο και τα επιμέρους στάδια της .Η διπλωματική αυτή στοχεύει στην ανάλυση των μεθόδων αυτών και των βιοδεικτών.

Απαρτίζεται από δύο ενότητες .Η πρώτη ενότητα χωρίζεται σε δύο κεφάλαια .Στο πρώτο γίνεται μία γρήγορη αλλά ολοκληρωμένη αναφορά στην νόσο , στην επιδημιολογία της, στην παθογένεια και στην διάγνωση .

Το δεύτερο κεφάλαιο αναφέρεται στους βιοδείκτες της μη αλκοολικής λιπώδη νόσου. Για να γίνουν κατανοητά τα μονοπάτια στα οποία είναι παρόντες και τον ρόλο που έχουν στην νόσο γίνεται επεξήγηση της ηπατικής λειτουργίας αρχικά και μετέπειτα του λιπώδη ιστού .Γίνεται επεξηγηματική αναφορά στο τρόπο ανεύρεσης και εκτίμησης ενός βιοδείκτη και εξηγούνται οι στρατηγικές προσέγγισης με παραδείγματα για κάθε μία .Αναφέρονται ένας προς έναν οι βιοδείκτες , η ακριβής τους λειτουργία καθώς και τα ρυθμιστικά μονοπάτια που μεσολαβούν .Για κάθε βιοδείκτη αναφέρονται και αποτελέσματα ερευνητικών μελετών .

Η δεύτερη ενότητα περιλαμβάνει τα πειραματικά αποτελέσματα της μελέτης που πραγματοποιήσαμε σε 176 εθελοντές , που ως σκοπό είχε την εκτίμηση των επιπέδων της IL 6 , ηπατικών ενζύμων , CRP γλυκόζης , χοληστερόλης κ.α σε άτομα με διαγνωσμένη μη αλκοολική λιπώδη διήθηση και σύγκρισή τους με τα επίπεδα υγιών ατόμων .

Κεφάλαιο Πρώτο

Μη αλκοολική λιπώδης νόσος του ήπατος

Ορισμός – επιδημιολογία

Η μη αλκοολική λιπώδης νόσος του ήπατος (Non Alcoholic Fatty Liver Disease) είναι σήμερα μία από τις συχνότερες αιτίες χρόνιας ηπατοπάθειας παγκοσμίως, η συχνότερη σε κάποιες χώρες, ιδιαίτερα σε πληθυσμούς με υψηλό ποσοστό παχυσαρκίας.

Χαρακτηρίζεται από διήθηση λίπους στο ήπαρ (ηπατική στεάτωση SS) , το οποίο υπερβαίνει το 5-10% του βάρους του με την μορφή τριγλυκεριδίων , σε άτομα που δεν καταναλώνουν σημαντικές ποσότητες αλκοόλ.Στην κλινική πράξη ο διαχωρισμός της NAFLD από την αλκοολική λιπώδη νόσο του ήπατος (ALD) είναι αρκετά δύσκολος καθώς οι ιστολογικές αλλοιώσεις της NAFLD είναι παρόμοιες με αυτές που παρατηρούνται σε ασθενείς με ηπατική νόσο αλκοολικής αιτιολογίας και απουσία δεδομένων βιοψίας ήπατος βασίζεται στο αυτοδηλούμενο ιστορικό

κατανάλωσης αλκοόλ του ασθενούς. Στις περισσότερες περιπτώσεις το μέγιστο επίπεδο κατανάλωσης αλκοόλ για τη διάγνωση της NAFLD ανέρχεται σε δύο ποτήρια αλκοόλ την ημέρα για τους άντρες (140g αιθανόλης/εβδομάδα) και ένα την ημέρα για τις γυναίκες (70g αιθανόλης/εβδομάδα) .

Το ιστολογικό φάσμα που καλύπτει είναι ευρύ , από μια απλή στεάτωση (NAFL SS), έως στεατο-ηπατίτιδα (NASH), δηλαδή στεάτωση με ταυτόχρονη φλεγμονή στο ήπαρ πράγμα που μπορεί να οδηγήσει σε ίνωση ακόμα και κίρρωση του ήπατος .

Η NAFLD θεωρείται η ηπατική εκδήλωση του μεταβολικού συνδρόμου και έχει αιτιολογικά συσχετιστεί με την παχυσαρκία και την αντίσταση στην ινσουλίνη.(διαβήτη τύπου 2).

Οι ασθενείς στην πλειονότητά τους είναι ασυμπτωματικοί ή με ελάχιστα συμπτώματα και η νόσος συνήθως αποκαλύπτεται τυχαία σε κάποιο βιοχημικό ή απεικονιστικό έλεγχο ρουτίνας.

Η διαγνωστική αυτή δυσχέρεια (έλλειψη ορολογικού δείκτη, απουσία βιοψίας ήπατος) καθιστούν δύσκολες τις επιδημιολογικές μελέτες της μη αλκοολικής λιπώδους νόσου του ήπατος. Με βάση απεικονιστικές κυρίως μεθόδους (συνήθως υπερηχογράφημα), ο επιπολασμός της λιπώδους διήθησης στο γενικό πληθυσμό αναφέρεται στις διάφορες χώρες από 9% μέχρι 30%. Ο επιπολασμός της μη αλκοολικής στεατοηπατίτιδας, για τη διάγνωση της οποίας απαιτείται βιοψία ήπατος, υπολογίζεται μεταξύ 2% και 7% του γενικού πληθυσμού.

Στην Ελλάδα ο επιπολασμός της Nafld υπολογίζεται σε 15% - 20% (17,6% σε μελέτες αιμοδοτών).

Σε ασθενείς με δείκτη μάζας σώματος (BMI) >35 Kg/m² ο επιπολασμός της απλής στεάτωσης φθάνει το 76%, της στεατοηπατίτιδας το 23% και της κίρρωσης το 6%, ενώ σε διαβητικούς ασθενείς ηπατική στεάτωση ανευρίσκεται σε ποσοστό 40% - 70%.Στα παιδιά υπάρχουν μελέτες που δείχνουν ποσοστό μη αλκοολικής λιπώδους νόσου του ήπατος γύρω στο 3%, ενώ σε παχύσαρκα παιδιά ξεπερνά το 50%

Από όλα τα παραπάνω στοιχεία φαίνεται το μέγεθος του προβλήματος. Η σοβαρότητά του, όμως, εξαρτάται από την παρουσία ή όχι στεατοηπατίτιδας (NASH), η οποία χαρακτηρίζεται από φλεγμονή και ίνωση, αύξηση των τρανσαμινασών και της γGT και επιβεβαιώνεται **μόνο με ιστολογική εξέταση** (εικόνα λιπώδους διήθησης και στεατοηπατίτιδας).

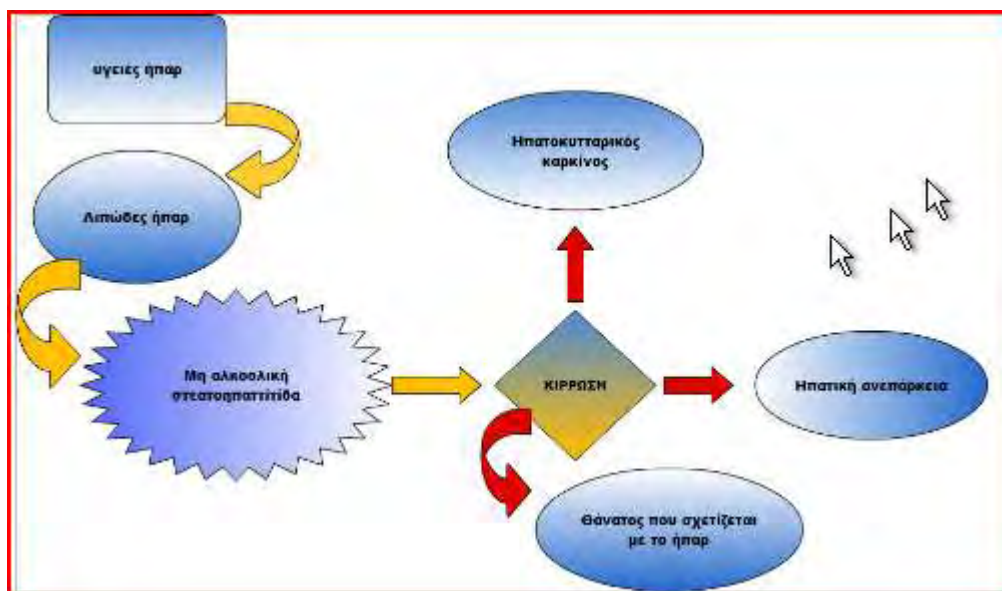
Η μη αλκοολική στεατοηπατίτιδα NASH εξελίσσεται σε κίρρωση (15% - 20%), ενώ τότε δεν είναι σπάνια και η ανάπτυξη **ηπατοκυτταρικού καρκίνου**.

Ο κυριότερος παράγοντας κινδύνου για την ανάπτυξη NAFLD είναι η παχυσαρκία, πιθανώς μέσω ανάπτυξης αντίστασης στην ινσουλίνη,ενώ αναφέρθηκε ήδη η επιβαρυντική παρουσία του διαβήτη τύπου 2.

Γενετικοί παράγοντες φαίνεται να παίζουν κάποιο ρόλο στην εμφάνιση και εξέλιξη

της νόσου, καθώς μερικές επιδημιολογικές μελέτες δείχνουν αυξημένη επίπτωση της NAFLD και της αντίστασης στην ινσουλίνη σε πρώτου βαθμού συγγενείς ασθενών με NAFLD, ενώ υπάρχουν σημαντικές φυλετικές διαφορές (χαμηλότερα ποσοστά NAFLD στους μαύρους).

Πειραματικές ενδείξεις συσχέτισης διαιτητικών συνηθειών με την ανάπτυξη NAFLD, μέσω πιθανών αλλαγών στην ευαισθησία στην ινσουλίνη και στο μεταγευματικό μεταβολισμό των τριγλυκεριδίων, δεν έχουν επαληθευθεί επαρκώς



από κλινικές μελέτες.

Εικόνα 1 : τα στάδια ανάπτυξης της μη αλκοολικής λιπώδους νόσου .Από ένα απλό λιπώδες ήπαρ (SS) εώς μη αλκοολική στεατοηπατίτιδα (NASH) που μπορεί να καταλήξει σε κίρρωση .

Παθογένεια

Η παθογένεια της μη αλκοολικής λιπώδους νόσου του ήπατος δεν είναι πλήρως διευκρινισμένη και κατανοητή. Φαίνεται, όμως, ότι πρωταρχικό ρόλο παίζει η αντίσταση στην ινσουλίνη, κύριο χαρακτηριστικό του μεταβολικού συνδρόμου, του οποίου η συσχέτιση με την NAFLD τελευταία αναγνωρίζεται όλο και περισσότερο.

Το μεταβολικό σύνδρομο (αρχικά σύνδρομο X) πρωτοπεριγράφηκε πριν από 20 χρόνια ως ένας συνδυασμός σημαντικών μεταβολικών διαταραχών .

Πέραν της αντίστασης στην ινσουλίνη, συνυπάρχουν παχυσαρκία (ιδιαίτερα κοιλιακή), σακχαρώδης διαβήτης τύπου II, υπέρταση και δυσλιπιδαιμία (υψηλά τριγλυκερίδια, χαμηλή HDL).

Ποσοστό περίπου 90% των ασθενών με NAFLD έχει τουλάχιστον ένα χαρακτηριστικό στοιχείο του μεταβολικού συνδρόμου, ενώ στο 1/3 των ασθενών αναγνωρίζεται το πλήρες φάσμα του συνδρόμου. Έτσι, σήμερα η NAFLD /NASH θεωρείται ότι αποτελεί την ηπατική εκδήλωση του μεταβολικού συνδρόμου (σε

>85% των περιπτώσεων)Η στεάτωση ή λιπώδης διήθηση του ήπατος χαρακτηρίζεται από συσσώρευση λιπιδίων, ειδικότερα τριγλυκεριδίων, στα ηπατοκύτταρα.

Η αντίσταση στην ινσουλίνη οδηγεί σε λίπωση των ηπατοκυττάρων μέσω αύξησης της λιπόλυσης στο λιπώδη ιστό και την κυκλοφορία αυξημένης ποσότητας FFA (ελεύθερα λιπαρά οξέα) και μέσω της υπερινσουλιαιμίας.

Η πρόσληψη των FFA από τα ηπατοκύτταρα οδηγεί σε κορεσμό των μιτοχονδριακών ενζυμικών συστημάτων οξείδωσης, οπότε αναλαμβάνεται ο μεταβολισμός τους από μικροσωμιακά ενζυμικά συστήματα (κυτόχρωμα P-450 2E1 και 4A), με αποτέλεσμα την παραγωγή ελεύθερων ριζών οξυγόνου που δρουν τοξικά (οξειδωση) στις κυτταρικές μεμβράνες.

Η αυξημένη παραγωγή ριζών οξυγόνου μπορεί να οφείλεται σε δράση της πρωτεΐνης 2, η οποία είναι πρωτεΐνη της μεμβράνης των μιτοχονδρίων.

Η υπερινσουλιαιμία αυξάνει τη σύνθεση FFA στα ηπατοκύτταρα με αύξηση της γλυκόλυσης, που συνοδεύεται από εναπόθεση των τριγλυκεριδίων στο κυτταρόπλασμα λόγω μειωμένης παραγωγής απολιποπρωτεΐνης B-100.

Οι ρίζες οξυγόνου που παράγονται στα μιτοχόνδρια δρουν τοξικά μέσω τριών μηχανισμών: Οξείδωσης των λιπών, παραγωγής κυτταροκινών και αύξησης της παραγωγής του συνδέτη Fas. Η οξείδωση των λιπών προκαλεί τον κυτταρικό θάνατο μέσω απελευθέρωσης των malondialdehyde (MDA) και 4-hydroxynonenal (HNE). Επιπλέον, τα MDA και HNE αντιδρούν με πρωτεΐνες οδηγώντας στη δημιουργία υαλίνης (σώματα Mallory) και ενεργοποιούν τα αστεροειδή κύτταρα που παράγουν συνδετικό ιστό.

Η HNE δρα χημειοτακτικά προσελκύοντας τα πολυμορφοπύρηνα, αυξάνοντας έτσι τη φλεγμονή του ηπατικού ιστού. Επιπλέον, οι ρίζες οξυγόνου προκαλούν την παραγωγή κυτταροκινών (παράγοντας νέκρωσης των όγκων TNF-α, αυξητικός παράγοντας μετατροπής –transforming growth factor– TGF-β και ιντερλευκίνης 8). Οι TNF-α και TGF-β ενεργοποιούν τις κασπάσες και οδηγούν στο θάνατο των ηπατοκυττάρων.

Επιπλέον, ο TGF-β ενεργοποιεί την παραγωγή ινώδους από τα αστεροειδή κύτταρα και τις τρανσγλουταμινάσες που δεσμεύουν τις πρωτεΐνες του κυτταροσκελετού, δημιουργώντας υαλίνη (σώματα Mallory).

Η ιντερλευκίνη-8 δρα έντονα χημειοτακτικώς, προσελκύοντας τα πολυμορφοπύρηνα. Ο TNF-α δυσχεραίνει την κυκλοφορία ηλεκτρονίων στην αναπνευστική αλυσίδα των μιτοχονδρίων. Εξάλλου, οι ρίζες οξυγόνου που παράγονται στα μιτοχόνδρια μειώνουν τις αποθήκες αντιοξειδωτικών στο ήπαρ δημιουργώντας φαύλο κύκλο.

Οι ρίζες οξυγόνου που παράγονται στα μιτοχόνδρια οδηγούν σε έκφραση συνδέτη Fas στα ηπατοκύτταρα, τα οποία φυσιολογικά εκφράζουν τον υποδοχέα Fas στην κυτταροπλασματική τους μεμβράνη. Έτσι, ο συνδέτης του ενός ηπατοκυττάρου ενώνεται με τον υποδοχέα του γειτονικού, οδηγώντας το στο θάνατο.

Συμπερασματικά, από τους ασθενείς με NAFLD, η μειοψηφία θα αναπτύξει NASH, με βάση γενετικούς και επιδημιολογικούς παράγοντες που θα επηρεάσουν το μέγεθος του οξειδωτικού stress –αυξημένη παραγωγή ριζών οξυγόνου– και της οξείδωσης των λιπών με παραγωγή κυτταροκινών που προκαλούν φλεγμονή στο ηπατικό παρέγχυμα και ενεργοποίηση των αστεροειδών κυττάρων για παραγωγή ινώδους συνδετικού ιστού.

Διάγνωση

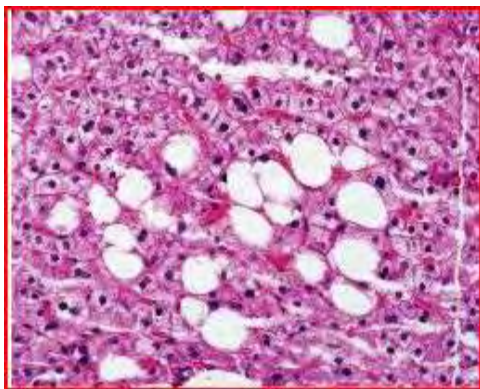
Ενώ η διάγνωση της απλής λιπώδους διήθησης (στεάτωσης) του ήπατος όταν αφορά σε ποσοστό >5% των ηπατοκυττάρων γίνεται σχετικά εύκολα με απεικονιστικές μεθόδους, κυρίως με υπερηχογράφημα (εικόνα 2) , η ειδική φύση της νόσου κάνει την περαιτέρω διάκριση των σταδίων και της εξέλιξης της ιδιαίτερα δύσκολη με μη επεμβατικές μεθόδους .

Κύριο μέλημα των ερευνητών είναι η ανακάλυψη μη επεμβατικών μεθόδων που αποκαλύπτουν την ύπαρξη της νόσου σε αρχικό στάδιο και η διάγνωση των ασθενών που έχει εξελιχθεί σε στεατοηπατιτίδα και ίνωση.

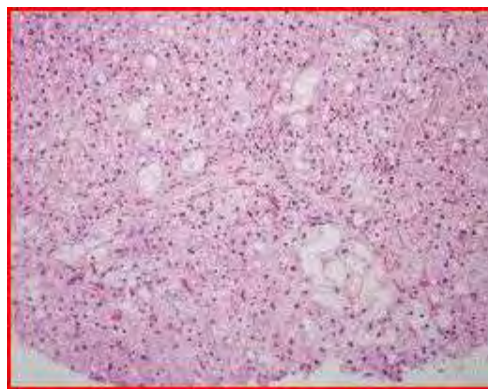
Η μόνη σίγουρη και έγκυρη μέθοδος αυτήν την στιγμή είναι η βιοψία ήπατος , Ωστόσο, υπάρχουν δισταγμοί για τη χρήση της σε ασθενείς με υποψία της νόσου εξαιτίας της επεμβατικής της φύσης, του πιθανού κινδύνου αιμορραγίας και θανάτου, του υψηλού κόστους της καθώς και της έλλειψης μιας ειδικής για τη νόσο θεραπείας. Σαν αποτέλεσμα, δεν έχουν υπάρξει έως τώρα κοινώς αποδεκτές κατευθυντήριες οδηγίες επί του θέματος και έτσι η απόφαση για διενέργεια βιοψίας ήπατος παραμένει στην κρίση του εκάστοτε κλινικού ιατρού.

Παρά ταύτα,βρίσκονται σε καλό δρόμο οι έρευνες που στοχεύουν στις εύρεση των παραγόντων αυτών που έχουν την ικανότητα ενδεχομένως να βοηθούν στην αναγνώριση των ασθενών με NASH,οι οποίοι τελικά, θα επωφεληθούν από τη βιοψία ήπατος.

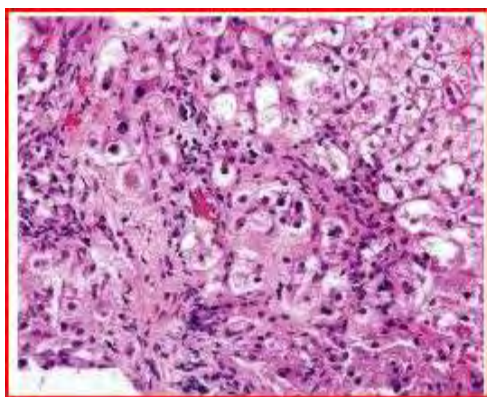
Προς αποφυγή της βιοψίας , χρησιμοποιούνται ευρέως και άλλες απεικονιστικές μέθοδοι εκτός από το υπερηχογράφημα όπως η μαγνητική και αξονική τομογραφία, η μαγνητική φασματογραφία, ο δείκτης ντόπλερ και η ελαστογραφία με διαφορετικά πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα η κάθε μία .



**Λιπώδες ήπαρ
SS**



NASH με Ύνωση



**Μη αλκοολική Στεατοηπατίτιδα
NASH**



Κίρρωση

Εικόνα 2:

Λιπώδες ήπαρ --Μη αλκοολική Στεατοηπατίτιδα-- NASH με Ύνωση-- Κίρρωση



Την τελευταία δεκαετία , πολλοί ερευνητές , έχουν στραφεί στην έρευνα για εύρεση, νέων μη επεμβατικών μεθόδων για την διάγνωση της νόσου .Τόσο η πολυπλοκότητα της , η μη ύπαρξη πέραν βιοψίας ακριβής μεθόδου διάγνωση ,η ασυμπτωματικότητα που την διακρίνει στις περισσότερες των περιπτώσεων και βεβαίως η επικινδυνότητα της σε συνδυασμό με το μεγάλο επιπολασμό στο

πληθυσμό , έχει κάνει αυτό το πεδίο , ενδιαφέρον μα και δύσκολο .

Οι μελέτες αναζητούν τον ιδανικό βιοδείκτη για την νόσο , αυτόν που με ευκολία (ευκολία χρήσης στην ρουτίνα του εργαστηρίου) ευαισθησία και εξειδίκευση να μπορεί να διαγνώσει την νόσο .Να έχει την ικανότητα διάκρισης της μη αλκοολικής λιπώδη νόσου από την αλκοολική λιπώδη νόσο και της απλής στεάτωσης από την στεατοηπατίτιδα και την ίνωση .

Υπάρχουν αρκετοί βιοχημικοί δείκτες που μπορούν να φανερώσουν μια διαταραχή στο ήπαρ που σχετίζεται με τη NAFLD. Σε κάθε περίπτωση όμως, οι δείκτες αυτοί, δεν είναι ειδικοί της νόσου. Ένα από τα πιο βασικά εργαστηριακά ευρήματα είναι αύξηση στα ηπατικά ένζυμα αμινοτρανσφεράση της αλανίνης (ALT) και ασπαρτική αμινοτρανσφεράση (AST).

Όμως σπάνια τα ένζυμα αυτά είναι 3-4 φορές μεγαλύτερα από το φυσιολογικό και μάλιστα σε ένα 10% των ασθενών είναι φυσιολογικά, ειδικά στα άτομα με απλή στεάτωση. Επίσης ο λόγος AST/ALT είναι σημαντικός καθώς λόγος μεγαλύτερος του 1 υποδεικνύει βλάβη . Εδώ πρέπει να επισημάνουμε ότι βελτίωση στα ένζυμα δεν συνεπάγεται απαραίτητα βελτίωση της κλινικής εικόνας της νόσου.

Η καλύτερη προσέγγιση είναι η δοκιμή δεικτών που έχουν άμεση σχέση με την παθοφυσιολογία της νόσου. Στόχος έχουν γίνει βιοδείκτες φλεγμονής και απόπτωσης , λιποκυτταροκίνες , βιοδείκτες οξειδωτικού στρές και ίνωσης .

Μια ακόμα καινούργια και πολλά υποσχόμενη προσέγγιση , είναι οι αλγόριθμοι , οι οποίοι με χρήση αρκετών παραμέτρων που σχετίζονται με την νόσο – κλινικών και βιοχημικών – εκτιμούν την ύπαρξη ή όχι αλλά και το στάδιο και το βαθμό , ίνωσης στεάτωσης ή στεατοηπατίτιδας . Η αξιολόγηση αυτών των αλγόριθμων , γίνεται με καμπύλες ROC .

Κεφάλαιο Δεύτερο



Ορισμός

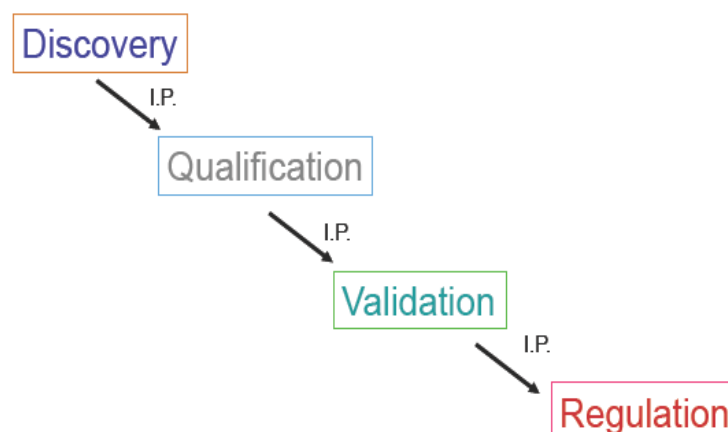
Βιοδείκτες ή βιολογικοί δείκτες , ορίζονται μετρήσιμες ουσίες που οι **διαφορές στην συγκέντρωσή** τους μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον **χαρακτηρισμό** μιας συγκεκριμένης βιολογικής κατάστασης , παραδείγματος χάριν , μίας ασθένειας .Τα βιομόρια αυτά , συνήθως αντανακλούν διαταραχές στην φυσιολογική λειτουργία του συστήματος και χρήση τους έχει σκοπό την διάγνωση την αξιολόγηση και την παρακολούθηση των διαταραχών αυτών .

Ως βιολογικοί δείκτες χρησιμοποιούνται κατά βάση οργανικές ουσίες(κύτταρα, πρωτεΐνες,ένζυμα,γονίδια)για τις οποίες γνωρίζουμε ότι υποδεικνύουν συγκεκριμένες βιολογικές διαδικασίες και είναι ένα από τα χρησιμότερα εργαλεία στην ιατρική διάγνωση.Το **1998** ο **Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας** όρισε την έννοια του βιοδείκτη ως «κάθε ουσία, που μπορεί αντικειμενικά να μετρηθεί και να εκτιμηθεί η επιρροή της σε φυσιολογικές η παθολογικές διαδικασίες και να προβλέψει την εμφάνιση ή τα αποτελέσματα μιας ασθένειας.

Ο **ιδανικός βιοδείκτης** πρέπει να έχει τα εξής χαρακτηριστικά

- διαγνωστική αποτελεσματικότητα, δηλαδή να μπορεί να εντοπίσει την παρουσία μίας ασθένειας με υψηλή αξιοπιστία
- να έχει υψηλή ευαισθησία και εξειδίκευση
- να βασίζεται σε μετρήσεις που γίνονται από ιστούς, η συλλογή των οποίων γίνεται με μη επεμβατικές μεθόδους
- το κόστος αλλά και η ευκολία χρήσης του να είναι τέτοια , ώστε να μπορεί εύκολα να ενσωματωθεί στην καθημερινή ρουτίνα ενός εργαστηρίου .

The Biomarker Research and Development Process



Εικόνα 3: η διαδικασία έρευνας και ανάπτυξης ενός νέου βιοδείκτη

Αξιολόγηση ενός νέου βιοδείκτη

Η διαλεύκανση των λειτουργιών των βιολογικών διαδικασιών είναι το κλειδί στη ανακάλυψη νέων βιοδεικτών και η σύγχρονη έρευνα μας έχει οδηγήσει στην καλύτερη κατανόηση τους σε σχέση με το παρελθόν.

Κάθε χρόνο,ερευνητές προτείνουν πολλούς δείκτες για χρήση προγνωστική, διαγνωστική για πλήθος ασθενειών. Η ανακάλυψη όμως ενός νέου βιοδείκτη, συνεπάγεται και την αξιολόγηση του και τελικά πολύ λίγοι από τους προτεινόμενους δείκτες φτάνουν να επιτύχουν στην αξιολόγηση αυτή.

Αρχικά στην **αξιολόγηση** ενός νέου βιοδείκτη , κρίνεται η **αξιοπιστία της αναλυτικής μεθόδου** που χρησιμοποιήθηκε και τα όρια τυχόν σφάλματος.

Η αναλυτική μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε πρέπει να φέρει τα εξής χαρακτηριστικά

1. **ακρίβεια**(μικρή απόκλιση από την αληθή)
2. **εξειδίκευση** (προσδιορισμού συγκεκριμένης ουσίας και όχι άλλης παρόμοιας)
3. **επαναληψιμότητα** (μικρή διασπορά τιμών)
4. **ευαισθησία**(μικρότερη δυνατή συγκέντρωσή ουσίας ουσίας που μπορεί η μέθοδος να αντιδιαστέλλει από το μηδέν

Αξιολόγηση της κλινικής (διαγνωστικής) αποτελεσματικότητας

- η **διαγνωστική αποτελεσματικότητα** ενός δείκτη, σχετίζεται με το πόσο καλά

μπορεί να προβλέψει την ασθένεια

Η κλινική **ευαισθησία** ενός βιοδείκτη είναι η πιθανότητα διάγνωσης(θετικό αποτέλεσμα) όταν πραγματικά υπάρχει η νόσος)

Την τιμή της ευαισθησίας που έχει ο βιοδείκτης μπορούμε να την λάβουμε αν διαιρέσουμε τους αληθώς θετικούς (ΑΘ) με όλους τους νοσούντες , δηλαδή με τους αληθώς θετικούς (ΑΘ) και τους ψευδώς αρνητικούς (ΨΑ) και το πολλαπλασιάσουμε με το 100

$$\text{Ευαισθησία} = \frac{\text{ΑΘ}}{(\Psi\text{Α} + \text{ΑΘ})} \times 100$$

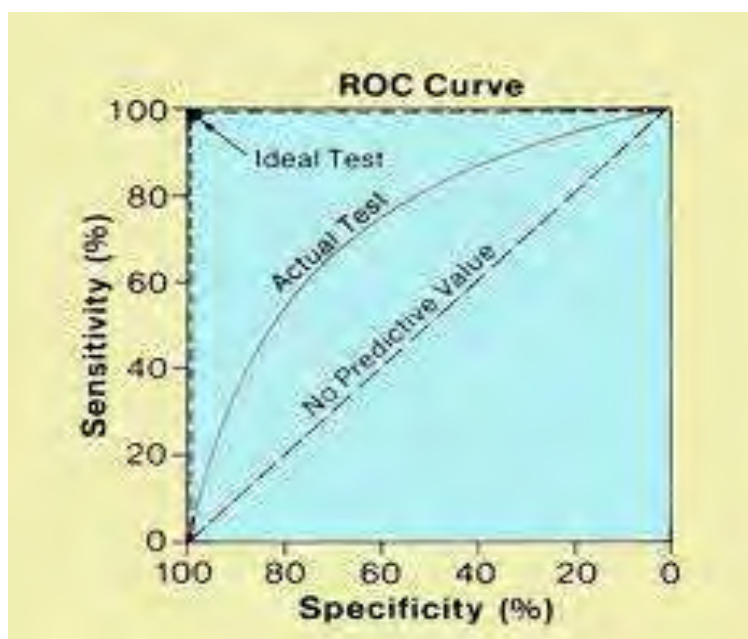
Η κλινική **εξειδίκευση** ενός βιοδείκτη , είναι η πιθανότητα να είναι αρνητικός , όταν δεν υπάρχει η νόσος .Την λαμβάνουμε όταν διαιρέσουμε τους αληθώς αρνητικούς(ΑΑ) με όλους του μη νοσούντες , δηλαδή τους αληθώς αρνητικούς(ΑΑ) και τους ψευδώς θετικούς(ΨΘ) και το πολλαπλασιάσουμε με το 100 .

$$\text{εξειδίκευση} = \frac{\text{ΑΑ}}{(\text{ΑΑ} + \Psi\Theta)} \times 100$$

Η εξειδίκευση και η ευαισθησία μεταβάλλονται αντιστρόφως ανάλογα και η απόφαση για το **σημείο αποκοπής** (cutoff value)εξαρτάται από πολλούς παράγοντες . Η πιο χρήσιμη μέθοδος για να βρεθεί η χρυσή τομή είναι η **καμπύλη ROC** (receiver operator characteristic curve) ή καμπύλη των λειτουργικών χαρακτηριστικών

Με τις καμπύλες ROC , μπορεί να φανεί η αποτελεσματικότητα μιας μεθόδου κάτω από διαφορετικές συνθήκες όπως διαφορετικά όρια αποκοπής η διαφορετικούς πληθυσμούς και διαφορετικές διαγνωστικοί μέθοδοι

- το σημείο της καμπύλης που είναι είναι πιο κοντά στην πάνω αριστερά γωνία αντιστοιχεί στην καταλληλότερη τιμή **αποκλεισμού(όριο απόφασης)** η οποία παρέχει την μεγαλύτερη διαγνωστική ακρίβεια , δηλαδή την μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα του προσδιορισμού .
- η περιοχή κάτω από την καμπύλη αντιστοιχεί στην ολική ακρίβεια της μεθόδου



Εικόνα 4: η καμπύλη των λειτουργικών χαρακτηριστικών ROC

Η προγνωστική αξία ενός βιοδείκτη

Ο υπολογισμός της **προγνωστικής αξίας** γίνεται έχοντας λάβει γνώση του **επιπολασμού** της ασθένειας .

Προγνωστική αξία θετικού αποτελέσματος prognostic value PV+ η πιθανότητα ενός θετικού αποτελέσματος να σχετίζεται με την ασθένεια σε έναν τυχαίο πληθυσμό .

Προγνωστική αξία αρνητικού αποτελέσματος PV- η πιθανότητα ένα αρνητικό να σχετίζεται με την υγεία σε έναν τυχαίο πληθυσμό .

$$PV+ = \frac{A\Theta}{(A\Theta + \Psi\Theta)} \times 100 \qquad PV- = \frac{A\Lambda}{(A\Lambda + \Psi\Lambda)} \times 100$$

*ακόμα και αν υπάρχει ένας πολύ καλός βιοδείκτης ,δεν είναι συνετό να ελεγχονται ασθένειες που έχουν πολυ μεγάλο επιπολασμό στο γενικό πληθυσμό.

*οταν ο επιπολασμός της νόσου είναι χαμηλός , η διαγνωστική ευαισθησία πρεπει να είναι όσο το δυνατόν μεγαλύτερη .

Προσεγγίσεις για την εύρεση του ιδανικού βιοδείκτη

Τα τελευταία δέκα χρόνια , πληθώρα ερευνών έχουν γίνει με σκοπό την εύρεση δείκτη ή συνδυασμό βιοδεικτών που θα μπορούσε να αναγνωρίσει σίγουρα και υπεύθυνα την Nafld και τα στάδια της .Οι έρευνες προσεγγίζουν ένα μεγάλο εύρος χαρακτηριστικών και μορίων από το mRNA και την πρωτεϊνική έκφραση στους ιστούς και μόρια του ορού του αίματος , έως μετρήσεις οξειδωτικού στρές, ή συσχετίσεις δημογραφικών στοιχείων .

Οι έρευνες αυτές χωρίζονται σε 3 κυρίως κατηγορίες

- έρευνες που χρησιμοποιούν μη στοχευμένη προσέγγιση (περιλαμβάνουν τεχνικές όπως μικροσυστοιχίες γονιδίων ή πρωτεϊνών που αξιολογούνται με rtPCR και GWA μελέτες)με το πλεονέκτημα της εύρεσης ενός νέου βιοδείκτη
- μελέτες συσχέτισης (συγκρίνουν τα επίπεδα των στοχευμένων δεικτών μεταξύ ασθενών και υγιούς πληθυσμού)Τέτοιοι δείκτες μετρούν παραδείγματος χάριν τα επίπεδα της κυκλοφορία στον ορό των ενζύμων του πλάσματος (ALT , AST ,GGT) , λιποκυτταροκίνες , (λεπτίνη αδιπονεκτίνη) δείκτες φλεγμονής (TNF α , CRP IL 6) δείκτες οξειδωτικού στρές (οξειδωμένη LDL)δείκτες ίνωσης(υαλουρονικό οξύ) και δείκτες απόπτωσης (CK18).
- Χρήση μαθηματικών μοντέλων με αλγόριθμους για την πρόβλεψη των σταδίων της νόσου. Η ικανότητα των μοντέλων αυτών, εκτιμάτε χρησιμοποιώντας ανάλυση AUROC .Τα τεστ αυτά χωρίζονται περαιτέρω σε κατηγορίες ανάλογα με την διάγνωση που στοχεύουν, σε αλγόριθμους διάγνωσης στεάτωσης , ίνωσης και NASH.

*****Στην συνέχεια του κειμένου , θα παραθέσουμε αναλυτικά τους βιοδείκτες συσχέτισης, όπως επίσης θα γίνει αναφορά στα αλγοριθμικά μοντέλα και στις μη στοχευμένες προσεγγίσεις με αναφορές σε μελέτες και έρευνες .Πριν από αυτό , για καλύτερη κατανόηση των μηχανισμών δράσης πάνω στους οποίους δρουν οι βιοδείκτες θα γίνει αναφορά των βασικών οργάνων και ιστών που δρα η νόσος , του ήπατος και του λιπώδη ιστού .***

Το ήπαρ

Το ήπαρ είναι το δεύτερο μεγαλύτερο όργανο και ο μεγαλύτερος αδένας του ανθρώπινου σώματος .Βρίσκεται στο δεξιό μέρος της κοιλιάς , που ονομάζεται δεξιό υποχόνδριο , και επεκτείνεται και στο κεντρικό και άνω μέρος της κοιλιάς του ονομάζεται επιγάστριο. Μεγάλο τμήμα του ήπατος καλύπτεται από το δεξιό και πλευρικό τόξο

Ζυγίζει περί το 1 με 1,5 κιλό και το βάρος του βρίσκεται διαρκώς σε σταθερή αναλογία σε σχέση με το βάρος του σώματος.

Το ήπαρ είναι εντυπωσιακά ευπροσάρμοστο. Μπορεί να παραμείνει λειτουργικό ακόμη και αν χάσει το 80-90% των κυττάρων του από κάποια νόσο.

Μπορεί ακόμη να αναγεννηθεί εντελώς μέσα σε μερικές εβδομάδες, αν ένα τμήμα του αφαιρεθεί κατά τη διάρκεια χειρουργικής επέμβασης . Όμως δεν είναι ένα άφθαρτο όργανο. Εκτός από την μη αλκοολική λιπώδη διήθηση που μελετάμε που είναι αποτέλεσμα της παχυσαρκίας και δυσλειτουργιών που αποφέρει στον οργανισμό αυτή και το μεταβολικό σύνδρομο, διάφορα ξеноβιοτικά και τοξικές ουσίες όπως το αλκοόλ και τα φάρμακα αλλά και ιοί όπως ο ιός της ηπατίτιδας Β και C είναι δυνατόν να προκαλέσουν μόνιμες βλάβες.

Όταν η ηπατική νόσος φτάσει σε προχωρημένο στάδιο (κίρρωση) ο υγιής ιστός αντικαθίστανται από ένα ουλώδη ιστό(διήθηση) και το συκώτι δεν μπορεί πια να επιδιορθώσει τη βλάβη που έχει υποστεί. Τότε χάνει τη λειτουργικότητα του έως ότου γίνει λειτουργικά ανεπαρκές.

Αν και στα αρχικά στάδια η κίρρωση μπορεί να θεραπευτεί, συνήθως ο μόνος αποτελεσματικός τρόπος θεραπείας είναι η μεταμόσχευση .Ένα υγιές ήπαρ έχει την μορφή κώνου, με μία λεία ελαστική επιφάνεια. Το χρώμα του είναι σκούρο καφέ προς το κόκκινο επειδή κάθε στιγμή συκρατεί περίπου μισό λίτρο αίμα. Διαιρείται σε δύο λοβούς: ένα μεγάλο δεξιό λοβό και ένα μικρότερο .

Το ήπαρ αιματώνεται με δύο τρόπους , λαμβάνει αρτηριακό αίμα απο την ηπατική αρτηρία και φλεβικό από την ηπατική πυλαία φλέβα.

Το αίμα από το έντερο , περιλαμβάνει προϊόντα πέψης ,φάρμακα και ξеноβιοτικές ουσίες που έχουν απορροφηθεί .

Το ήπαρ είναι το μοναδικό εσωτερικό όργανο του ανθρώπινου σώματος που έχει την ικανότητα φυσικής αναγέννησης ελλείποντος ιστού. Αρκεί μόνο το 25% του ηπατικού ιστού για να αναγεννηθεί το πλήρες ήπαρ.(Παρ' όλα αυτά, αυτό δεν αποτελεί αληθή αναγέννηση αλλά μάλλον αντιρροπιστική ανάπτυξη).Οι λοβοί που έχουν αφαιρεθεί δεν αναπτύσσονται ξανά και η αναγέννηση του ήπατος αφορά την αποκατάσταση της λειτουργίας του και όχι της φυσιολογικής του δομής. Αυτό έρχεται σε αντίθεση με την αληθή αναγέννηση, όπου αποκαθίστανται τόσο η

λειτουργικότητα όσο και η μορφή.

Κυρίως, αυτό οφείλεται στα ηπατοκύτταρα, τα οποία επανεισάγονται στον κυτταρικό κύκλο, δηλαδή μεταπίπτουν από την ανενεργή G₀ φάση του κύκλου στην G₁ φάση και υφίστανται μίτωση. Η διαδικασία αυτή ενεργοποιείται από τους p75 υποδοχείς. [Υπάρχουν επίσης ενδείξεις για κάποια πολυδύναμα βλαστικά κύτταρα, που ονομάζονται πρόδρομα ηπατικά κύτταρα, και πιστεύεται ότι βρίσκονται στους πόρους του Hering. Αυτά τα κύτταρα μπορούν να διαφοροποιηθούν είτε σε ηπατοκύτταρα είτε σε χολαγγειοκύτταρα (τα κύτταρα που επενδύουν τους χοληφόρους πόρους).

Οι λειτουργίες του ήπατος

Οι **εκκρινικές λειτουργίες** του ήπατος χωρίζονται σε δύο κατηγορίες .

Τις **πεπτικές – εξωκρινείς** λειτουργίες και τις **ενδοκρινείς**

Οι πεπτικές περιλαμβάνουν την σύνθεση και έκκριση χολικών αλάτων που είναι απαραίτητα για την επαρκή πέψη και απορρόφηση των τροφών και την έκκριση στην χολή , μίας ουσίας πλούσιας σε ανόργανα όξινα ιόντα (διττανθρακικά) που συμβάλουν στην εξουδετέρωση των οξέων του δωδεκαδάχτυλου.

Οι ενδοκρινείς λειτουργίες είναι οι εξής

- Σε απόκριση στην GH , παράγει τον ινσουλινομιμικό παράγοντα IGF 1
- Συμβάλλει στην ενεργοποίηση της βιταμίνης D
- σχηματίζει T₃ από T₄
- εκκρίνει αγγειοτενσινογόνο στο οποίο επενεργεί η ρενίνη για το σχηματισμό αγγειοτενσίνης 1
- Μεταβολίζει την ινσουλίνη και άλλες ορμόνες

Άλλες λειτουργίες του ήπατος

Το ήπαρ συμβάλλει στην πήξη του αίματος , παράγοντας πολλούς από τους παράγοντες πήξης, όπως την προθρομβίνη και του ινωδογόνου. Παράγει χολικά άλατα απαραίτητα για την γαστρεντερική απορρόφηση της βιταμίνης K .

Συνθέτει και εκκρίνει στο πλάσμα του αίματος λευκωματίνη , τις πρωτεΐνες οξείας φάσης,προσδετικές πρωτεΐνες των στεροειδών ορμονών , ιχνοστοιχεία,λιποπρωτεΐνες (HDL VLDL) και σφαιρίνες.Το ήπαρ αποτελεί χώρο αποθήκευσης γλυκόζης (με τη μορφή γλυκογόνου) βιταμίνης A , D, b12 σιδήρου και χαλκού .

Μεταβολισμός οργανικών ουσιών

- Το ήπαρ μετατρέπει τη γλυκόζη σε γλυκογόνο και τριγλυκερίδια κατά την απορροφητική φάση

- Μετατρέπει τα αμινοξέα του πλάσματος σε λιπαρά οξέα, τα οποία μπορούν να ενσωματωθούν σε τριγλυκερίδια κατά την απορροφητική φάση .
- Συνθέτει τριγλυκερίδια και τα εκκρίνει ως λιποπρωτεΐνες κατά την εκκριτική φάση .
- Παράγει γλυκόζη από γλυκογόνο (γλυκογονόλυση) και από άλλες πηγές (γλυκονεογένεση) και την μετααπορροφητική φάση .Απελευθερώνει την γλυκόζη στο αίμα.
- Μετατρέπει λιπαρά οξέα σε κετονοσώματα κατά την νηστεία
- παράγει ουρία , το τελικό προϊόν του μεταβολισμού των αμινοξέων , την οποία απελευθερώνει στο αίμα .

Μεταβολισμός χοληστερόλης

- Συνθέτει και απελευθερώνει χοληστερόλη στο αίμα
- εκκρίνει την χοληστερόλη του πλάσματος στη χολή
- μετατρέπει τη χοληστερόλη του πλάσματος σε χολικά άλατα

Εξωκρινείς και διασπαστικές λειτουργίες

- Εκκρίνει χολερυθρίνη και άλλες χρωστικές στη χολή
- αποβάλλει μέσο της χολής ενδογενείς και ξένα οργανικά μόρια , καθώς και ιχνοστοιχεία
- καταστρέφει γερασμένα ερυθροκύτταρα.
- Μεταβολισμός χολερυθρίνης

Ο λιπώδης ιστός

Ο λιπώδης ιστός αποτελεί *ειδικό τύπο συνδετικού ιστού* στον οποίο επικρατούν τα **λιπώδη κύτταρα** (λιποκύτταρα). Τα λιποκύτταρα απαντούν μεμονωμένα, σε μικρές ομάδες και ως επί το πλείστον σε μεγάλες συσσωρεύσεις που περιβάλλονται από δοκίδες ινώδους συνδετικού ιστού, συγκροτώντας ένα όργανο με πολλές διαφορετικές αποθήκες, το λιπώδη ιστό .

Μόνο το 1/3 του λιπώδους ιστού περιέχει ώριμα λιποκύτταρα. Τα υπόλοιπα 2/3 αποτελούνται από πρόδρομα λιπώδη κύτταρα, γνωστά ως προλιποκύτταρα, από κύτταρα του στρώματος (stromal vascular fraction - SVF) του λιπώδους ιστού, όπως

ενδοθηλιακά κύτταρα, λεία μυϊκά κύτταρα των μικρών αγγείων, ινοβλάστες και μακροφάγα, αλλά και από νευρικό ιστό. Τα ώριμα λιποκύτταρα απαντούν σε δύο τύπους, τα *λευκά* και τα *φαιά* λιποκύτταρα. Οι δύο κυτταρικοί τύποι διακρίνονται τόσο ως προς το χρώμα, όσο και ως προς τη λειτουργία. Ο λευκός λιπώδης ιστός, που έχει υποκίτρινη χροιά, περιέχει κυρίως λευκά λιποκύτταρα, ενώ ο φαιός, που εμφανίζεται ως καστανόχρους, περιέχει κυρίως φαιά λιποκύτταρα.

Τα λιποκύτταρα παίζουν ένα σπουδαίο φυσιολογικό ρόλο, ρυθμίζοντας τα επίπεδα των τριγλυκεριδίων και των λιπαρών οξέων στο αίμα εντός ενός ορισμένου εύρους τιμών και καθορίζοντας την αντίσταση στην ινσουλίνη. Το κοιλιακό λίπος ιδιαίτερα έχει ένα διαφορετικό μεταβολικό προφίλ έχοντας την τάση να προκαλεί αντίσταση στην ινσουλίνη. Έτσι εξηγείται γιατί χρησιμοποιείται (το κοιλιακό λίπος) ως δείκτης ανεκτικότητας στη γλυκόζη και ως ανεξάρτητος παράγοντας κινδύνου εκδήλωσης καρδιαγγειακών παθήσεων (ακόμα και απουσία διαβήτη (diabetes mellitus) και υπέρτασης).

Τα λευκά λιποκύτταρα έχουν 3 φυσιολογικές λειτουργίες

- **Μεταβολισμός των λιπιδίων και γλυκόζης**

Μετά από γεύμα, τα λιποκύτταρα αποθηκεύουν προσωρινά τα προϊόντα της πέψης με τη μορφή **τριακυλογλυκερολών** (3 μόρια λιπαρών οξέων συνδεδεμένα με εστερικό δεσμό με ένα μόριο γλυκερόλης). Το λιποκύτταρο είναι ικανό να αποθηκεύσει μεγάλα ποσά τριγλυκεριδίων στα ενδοκυττάρια αποθηκευτικά σταγονίδια, που μπορούν να υπερβούν τα 50μm σε διάμετρο. Αντίθετα, σε περίοδο νηστείας, το λιποκύτταρο διαθέτει βιοχημικούς μηχανισμούς υδρόλυσης των τριγλυκεριδίων σε ελεύθερα λιπαρά οξέα και γλυκερόλη. Στη συνέχεια, αποδίδει τα προϊόντα της υδρόλυσης στην κυκλοφορία. Τα ελεύθερα λιπαρά οξέα χρησιμοποιούνται από τους ιστούς, κυρίως **μέσω β-οξειδωσης**, για την παραγωγή ενέργειας (ATP), ενώ η γλυκερόλη επαναχρησιμοποιείται από το ήπαρ για τη σύνθεση τριακυλογλυκερολών. Η ρύθμιση του μεταβολισμού των λιπιδίων ελέγχεται από τρεις βασικές κυτταρικές λειτουργίες: την **πρόσληψη λιπαρών οξέων**, τη **λιπογένεση** (σύνθεση λιπαρών οξέων και τριγλυκεριδίων) και τη **λιπόλυση** (υδρόλυση τριγλυκεριδίων). Κάθε μία από τις μεταβολικές αυτές διαδικασίες μεταβάλλεται ανταποκρινόμενη σε εξωκυττάρια ερεθίσματα, όπως η ινσουλίνη, η κορτιζόλη, οι κατεχολαμίνες, η αυξητική ορμόνη, η τεστοστερόνη, τα ελεύθερα λιπαρά οξέα και οι κυτταροκίνες. Η διαδικασία της λιπόλυσης περιλαμβάνει τη σταδιακή υδρόλυση των τριγλυκεριδίων σε διγλυκερίδια, μονογλυκερίδια και τελικά γλυκερόλη και λιπαρά οξέα. Η λιπόλυση καταλύεται από τρία ένζυμα, τη λιπάση των μονογλυκεριδίων (monoglyceride lipase – MGL), που καταλύει την υδρόλυση των μονογλυκεριδίων σε γλυκερόλη και λιπαρά οξέα, την ορμονοευαίσθητη λιπάση (hormone sensitive lipase – HSL), που καταλύει την υδρόλυση των τριγλυκεριδίων σε διγλυκερίδια και την υδρόλυση των διγλυκεριδίων σε μονογλυκερίδια, και την ειδική για το λιπώδη ιστό **λιπάση των τριγλυκεριδίων**.

(adipose- tissue- specific triglyceride lipase – ATGL), που καταλύει την υδρόλυση των τριγλυκεριδίων σε διγλυκερίδια και λιπαρά οξέα .Σημαντικότερο για τη διαδικασία ένζυμο είναι η ορμονοευαίσθητη λιπάση, γιατί είναι το μόνο ένζυμο που υφίσταται ορμονικό έλεγχο. Η διαδικασία της λιπόλυσης υπόκειται σε **αυστηρή ρύθμιση** .Στον άνθρωπο, οι κατεχολαμίνες ασκούν τον άμεσο έλεγχο.Επίσης, τα νατριουρητικά πεπτίδια είναι ισχυροί επαγωγείς της λιπόλυσης, ενώ η ινσουλίνη την αναστέλλει. Ακόμη, μακροχρόνια δράση της GH ενισχύει τη λιπόλυση. Από την άλλη πλευρά, η ρύθμιση της διαδικασίας γίνεται και με παρακρινή τρόπο, όπου συμμετέχουν ουσίες εκκρινόμενες από τα λιποκύτταρα και τα κύτταρα του στρώματος του λιπώδους ιστού, όπως είναι η αδενοσίνη, οι προσταγλανδίνες και οι κυτταροκίνες, ειδικά ο TNF- α.

Σημαντική μεταβολική λειτουργία των λιποκυττάρων είναι ο **μεταβολισμός της γλυκόζης** . Τα λιποκύτταρα, τα σκελετικά και τα καρδιακά μυικά κύτταρα, είναι τα μόνα γνωστά κύτταρα που εκφράζουν τον ινσουλινοεξαρτώμενο μεταφορέα γλυκόζης **GLUT4**, ο οποίος μεσολαβεί στη μεταγευματική μεταφορά της γλυκόζης από το αίμα στο εσωτερικό των κυττάρων, για χρησιμοποίηση και αποθήκευση.

Ο λιπώδης ιστός ως εκκριτικό όργανο .

Η παθογένεια της μη αλκοολικής λιπώδης νόσου , σχετίζεται άμεσα με την φυσιολογικές λειτουργίες των λιποκυττάρων , τόσο στο μεταβολισμό των λιπιδίων και της γλυκόζης που αναφέραμε παραπάνω , αλλά περισσότερο στην ενδοκρινή παρακρινή και αυτοκρινή του λειτουργία .Ο λιπώδης ιστός δεν είναι μόνο μια απλή αποθήκη ενέργειας με τη μορφή λίπους. Παράγει και εκκρίνει πληθώρα παραγόντων με ποικιλία δράσεων και όχι μόνο μεταβολικών. Η εκκριτική δραστηριότητα του λευκού λιπώδους ιστού (WAT) δεν είναι ίδια σε όλες τις ανατομικές περιοχές του σώματος. Το λίπος π.χ. της περιτοναϊκής κοιλότητας, ως περισσότερο ‘ευαίσθητο’ στα λιπολυτικά ερεθίσματα, έχει σημαντικότερη ευθύνη για την εμφάνιση ινσουλινοαντίστασης, διαβήτη 2 και καρδιο-αγγειακών νόσων .

Η παραγωγή από τον ιστό ενός πλήθους **κυττοκινών** , οδήγησαν στην επικράτηση του όρου **λιποκυτταροκίνες** .Πολλές από αυτές είναι αξιόπιστοι **δείκτες** στην διάγνωση της Nafld .

Ο λιπώδης ιστός ως εκκριτικό όργανο παράγει

- **Κυτταροκίνες:** TNFα, IL-1β, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-18, macrophage migration inhibitory factor (MIF)
- **Παράγοντες ανάλογοι του συμπληρώματος:** adiponectin, adipisin, acylation stimulating protein (ASP)

- **Παράγοντες μεταβολικών οδών και ενδοκυττάριας μεταφοράς ερεθίσματος:** leptin, resistin, omentin, vaspin, apelin, visfatin, adipocyte fatty acid binding protein (aP2), apolipoprotein E (apoE), retinol binding protein 4 (RBP4), παράγωγα της COX μεταβολικής οδού (prostacyclin PGE2 & PGI2), nitric oxide synthase pathway, σύστημα renin-angiotensin, ιστικοί ανατολείς των μεταλλοπρωτεϊνών (TIMPs)
- **Αυξητικοί και αγγειογενετικοί παράγοντες:** IGF-1, angiopoietin factor 1 & 2, FGFs (fibroblast growth factors), hepatocyte growth factor (HGF), nerve growth factor (NGF), vascular endothelial cell growth factor (VEGF), transforming growth factor- β (TGF β), tissue factor 3 (TF-3)
- **Μόρια προσκόλλησης και συστατικά του συνδετικού ιστού:** α 2-macroglobulin, vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1), intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), κολλαγόνο I, III, IV και VI, fibronectin, matrix metalloproteinase (MMP) 1, 7, 9, 10, 11, 14, 15, lysyl oxidase
- **Πρωτεΐνες οξείας φάσης:** C αντιδρώσα πρωτεΐνη (CRP), serum amyloid A3 (SAA3), plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1), Haptoglobin Χυμοκίνες: chemerin, monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1), macrophage inhibitory protein-1 alpha (MIP-1 α), regulated upon activation, normally T cell expressed and secreted (RANTES)
- **Μεμβρανικοί και πυρηνικοί υποδοχείς:** Μεμβρανικοί= Ινσουλίνης, γλυκαγόνης, γαστρίνης, αντιπυρεκτίνης, αυξητικής ορμόνης και αγγειοτενσίνης II. Πυρηνικοί= Θυρεοειδικές ορμόνες, PPAR γ , οιστρογόνα, ανδρογόνα, προγεστερόνη, γλυκοκορτικοειδή, βιταμίνη D.

Στοχευμένες Μελέτες – Μελέτες συσχέτισης

Εργαστηριακές δοκιμασίες ρουτίνας
βιοχημικές δοκιμασίες ηπατικής λειτουργίας

Υπάρχει μία πληθώρα εξετάσεων , για την ανάλυση της ηπατικής λειτουργίας και για την διάγνωση νόσων του.Τόσο η σημαντική φυσιολογική λειτουργία του όσο και η σημαντικότητα των ουσιών που μεσολαβούν για αυτές τις λειτουργίες στον οργανισμό , κάνουν τις ασθένειες του ήπατος ιδιαίτερες σοβαρές.

Ο κεντρικός ρόλος στις λειτουργίες του οργανισμού που κατέχουν τα κύτταρα του ήπατος είναι ο λόγος που που γίνεται συχνά στόχος εστιακών βλαβών .

Στο ιστό του ήπατος μπορεί να δημιουργηθούν καλοήγη νεοπλάσματα επιθηλιακής και μη προέλευσης και ογκόμορφες αλλοιώσεις .Κίρρωση και ηπατίτιδα μπορεί να προκαλέσουν πολλοί και διαφορετικοί παράγοντες όπως λοιμώξεις, τραυματισμό, έκθεση σε φάρμακα ή τοξικές ουσίες, κάποια αυτοάνοση διεργασία ή κάποια γενετική ανωμαλία. Όλα τα παραπάνω καθιστούν τη μελέτη και ανίχνευση των πρωταρχικών αίτιων της εκάστοτε ηπατικής δυσλειτουργίας ,ένα δύσκολο αλλά και συνάμα ελπιδοφόρο πεδίο επιστημονική έρευνας .

Ενζυμα πλάσματος

Τρανσαμινάσες

Πρόκειται για δύο πολύ γνωστά ένζυμα που χρησιμοποιούνται για την διάγνωση παθήσεων κυρίως του ήπατος αλλά και της καρδιάς

Ονομάζονται αμινοτρανσφεράσες (ή τρανσαμινάσες) επειδή η λειτουργία τους στον οργανισμό είναι να μεταφέρουν αμινομάδες από αμινοξέα σε μια ομάδα χημικών ενώσεων που ονομάζονται οξοκετογλουταρικά. Τα ένζυμα αυτά είναι γνωστά με τους παρακάτω συμβολισμούς και ονόματα:

Διεθνής συμβολισμός	Ελληνική ονομασία	Διεθνής συμβολισμός	Ελληνική ονομασία
ALT	Ασπαρτική αμινοτρανσφεράσ η	SGOT ή GOT	Οξαλοξική τρανσαμινάση
AST	Αλανική αμινοτρανσφεράσ η	SGPT ή GPT	Πυροσταφιλική τρανσαμινάση

Πίνακας 1:ονοματολογία ηπατικών ενζύμων πλάσματος

Υπάρχουν αρκετοί βιοχημικοί βιοδείκτες που μπορούν να φανερώσουν ηπατική βλάβη που σχετίζεται με την μη αλκοολική λιπώδη νόσο .Αλλά ένα από τα πιο βασικά εργαστηριακά ευρήματα είναι η αύξηση στα ηπατικά ένζυμα αμινοτρανσφεράση της αλανίνης και ασπαρτική αμινοτρανσφεράση .

Ωστόσο η ευαισθησία των ηπατικών ενζύμων σαν μεμονωμένοι δείκτες για την διάγνωση της NAFLD δεν είναι μεγάλη.Η αύξηση στην ασπαρτική αμινοτρανσφεράση και στην αλανική αμινοτρανσφεράση , όπου υπάρχει είναι μικρή και συνήθως δεν ξεπερνά τις τέσσερις φορές υψηλότερη από τα φυσιολογικά .Ο λόγος ALT/AST συνήθως είναι μικρότερος του 1 σε ασθενείς με καθόλου ή σε αρχικά στάδια ίνωση , ωστόσο σε ασθενείς με ανεπτυγμένη κίρρωση ο λόγος μπορεί να ξεπεράσει το 1 .

Εκτός αυτού, ο λόγος ALT/AST είναι το εργαλείο που μας χρησιμεύει στη διάκριση της ηπατικής βλάβης από αλκοολισμό ή όχι . Αν έχει τιμή $< 2,0$ τότε πρόκειται για αλκοολική ηπατική βλάβη ενώ αντίθετα αν $AST/ALT > 2,0$ τότε η βλάβη του ήπατος δεν οφείλεται στο αλκοόλ . Σημειώνεται πώς στο 70% των ατόμων με NAFLD τα επίπεδα των ηπατικών ενζύμων ανευρίσκονται φυσιολογικά και κατά συνέπεια δε συμβάλλουν στη διάγνωση .

Ενζυμική μέθοδος προσδιορισμού AST,GOT

L ασπαραγινικό οξύ + α κετογλουταρικό ^{AST} + Οξαλοξικό + γλουταμινικό

οξαλοξικό οξύ + NADH + H^+ + μηλικό οξύ
(μείωση απορρόφησης στα 340nm)

Μέθοδος προσδιορισμού ALT,GPT

L αλανίνη + α κετογλουταρικό οξύ ^{ALT} + πυροσταφυλικό οξύ + γλουταμινικό
πυροσταφυλικό οξύ + NADH + H^+ + γαλακτικό οξύ
(μείωση απορρόφησης στα 340nm)

γ -γλουταρυλ-τρανσπεπτιδάση (γ-GT)

Η γ-GT , που λέγεται επίσης και γ γλουταμινική τρανσφεράση , είναι το ένζυμο που δρα σε πεπτίδια ή άλλες ενώσεις που φέρουν στην άκρη γλουταμινικό οξύ (Glu) πεπτιδικά ενωμένο μέσο της γ καρβοξυλομάδας $\gamma COOH$, και το μεταφέρει σε έναν αποδέκτη , πεπτίδιο αμινοξύ κ.α .Βρίσκεται σε υψηλές συγκεντρώσεις στο ήπαρ στους νεφρούς και στο πάγκρεας.

Η αύξηση της ,συχνά εμφανίζεται σε ασθενείς με NAFLD , ωστόσο δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως μοναδικός δείκτης για την διάγνωση της .

Έρευνες (1)έχουν δείξει ότι η γ GT μπορεί να χρησιμεύσει ως δείκτης που μπορεί να διακρίνει τους ασθενείς αυτούς με Nafld που είναι σε υψηλότερο κίνδυνο.

Η ηπατοκυτταρική απόπτωση αποτελεί έναν σημαντικό προγνωστικό δείκτη ηπατικής βλάβης και ίνωσης στην μη αλκοολική λιπώδη νόσο του ήπατος και ο αυξητικός παράγοντας των ηπατοκυττάρων (HGF hepatocellular growth factor) που διεγείρει την ινωγένεση σχετίζεται με την γ Gt .

Αποτελέσματα έρευνας σε 50 ασθενείς με NAFLD έδειξαν ότι τα αυξημένα επίπεδα γ Gt μπορούν να διαγνώσουν την προχωρημένη ίνωση με ευαισθησία 83% και 69% ειδικότητα .

Εδώ θα πρέπει να τονίσουμε ότι πολύ αυξημένα επίπεδα γ GT συνήθως εμφανίζονται και σε ασθενείς με αλκοολική κίρρωση.

Ηλικία	Άνδρες	Γυναίκες
< 6 μηνών	12 - 122 IU/l	15 - 132 IU/l
6 – 12 μηνών	≤ 45 IU/l	≤ 44 IU/l
1 – 12 ετών	≤ 30IU/l	≤ 28IU/l
13 – 18 ετών	≤ 48 IU/l	≤ 32 IU/l
> 18 ετών	≤ 54 IU/l	≤ 36 IU/l

Πίνακας 2 : γ GT ,φυσιολογικά επίπεδα,ανάλογα με το φύλο και την ηλικία.

Λιποκυτταροκίνες

&

βιοδείκτες φλεγμονής

Η *μη αλκοολική λιπώδης νόσος* του ήπατος , έχει *άμεση σχέση* με την *παχυσαρκία* και τον *σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2* .

Τα αυξημένα επίπεδα δεικτών φλεγμονής, τόσο προφλεγμονωδών κυτταροκινών, όσο και πρωτεϊνών οξείας φάσης στο αίμα παχύσαρκων ατόμων , έχουν οδηγήσει τους επιστήμονες στην άποψη ότι η παχυσαρκία αποτελεί από μόνη της είναι μία μετρίου βαθμού χρόνια φλεγμονή .

Η φλεγμονή είναι μια ανοσολογική άμυνα του οργανισμού .Είναι ένας μηχανισμός που χρησιμοποιεί το σώμα για να προστατεύεται από την εισβολή ξένων οργανισμών και για την αποκατάσταση των ιστικών τραυμάτων. Οι τοπικές φλεγμονώδεις απαντήσεις ξεκινούν όταν ο τραυματισμένος ή μολυσμένος ιστός ενεργοποιεί την χυμική και κυτταρική ανοσία. Κατασκευάζονται πρωτεΐνες του συμπληρώματος και κυτταροκίνες. Αυτές οι πρωτεΐνες ενεργοποιούν έναν καταρράκτη χημικών γεγονότων με σκοπό την αποκατάσταση .

Τα κλινικά δεδομένα στους διεγνωσμένους ασθενείς με Nafld και κυρίως σε όσους έχει εξελιχθεί σε NASH , αποφαίνονται ότι αιτιολογικό ρόλο στην παθογένεια τους κατέχει η φλεγμονή .Τα αυξημένα επίπεδα σε IL6 , CRP , TNF-a , λεπτίνη και αδιπονεκτίνη σε αυτούς τους ασθενείς έχουν οδηγήσει στην χρήση τους ως βιοδείκτες διάγνωσης της νόσου και κυρίως της διάγνωσης όσων εκτός από την απλή στεάτωση έχουν και φλεγμονή (στεατοηπατίτιδα NASH) .

IL-6

Η *Ιντερλευκίνη-6 (IL-6)* ή αλλιώς Ιντερφερόνη 2, παράγοντας διαφοροποίησης β-κυττάρων, αυξητικός παράγοντας του υβριδώματος κτλ. είναι μια πολυπαραγοντική κυτταροκίνη που συμμετέχει στη ρύθμιση της *οξείας φλεγμονώδους* απάντησης και στην τροποποίηση των ειδικών ανοσολογικών αντιδράσεων. Εκτός του ρόλου της σε ανοσολογικές/ φλεγμονώδεις διαδικασίες, η

IL-6 συμμετέχει σε πολλές βιολογικές και παθοφυσιολογικές διαδικασίες όπως ο μεταβολισμός των οστών, η θρομβοποίηση, ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων της επιδερμίδας, η έμμηνος ρύση, η διαφοροποίηση των νευρικών κυττάρων, η γήρανση και ο καρκίνος.

Παράγεται όχι μόνο από τα κύτταρα της *κυτταρομεσολαβητικής ανοσίας* (T και B λεμφοκύτταρα) αλλά και από βοηθητικά, όπως τα μονοκύτταρα, τα μακροφάγα, τα ενδοθηλιακά, τους ινοβλάστες, τα μαστοκύτταρα, τα αστροκύτταρα και τη μικρογλοία. Ακόμα, παράγεται από τους οστεοβλάστες, τα στηρικτικά κύτταρα του ουελού των οστών, τα κερατινοκύτταρα, τα χονδροκύτταρα, τα επιθηλιακά κύτταρα του εντέρου, τα κύτταρα Leydig των όρχεων, τα κύτταρα της υπόφυσης, τα στηρικτικά κύτταρα του ενδομητρίου, οι τροφοβλάστες και τα λεία μυϊκά κύτταρα των αγγείων . Ασκεί την δράση της μέσω του υποδοχέα της και η ενδοκυτταρική μεταγωγή σήματος γίνεται μέσω του μονοπατιού JAK/STAT .

Η IL6 έχει σπουδαίο *ρόλο ως δείκτης* στην *NAFLD* και κυρίως στη *NASH* , λόγω στη διαμεσολάβηση της στις *φλεγμονώδεις καταστάσεις* .Η δράση της ασκείτε με το να ενεργοποιεί την διαφοροποίηση και ωρίμανση των B κυττάρων, την παραγωγή των ανοσοσφαιρινών από αυτά και τον πολλαπλασιασμό και διαφοροποίηση των T κυττάρων. Επίσης, αυξάνει την αγγειακή διαπερατότητα, την παραγωγή αιμοπεταλίων και κινητοποιεί τα ουδετερόφιλα από τον μυελό των οστών. Όμως, η IL-6 φαίνεται να έχει ρόλο κλειδί και στην μετάβαση από την οξεία στην χρόνια φλεγμονή. Η μετάβαση αυτή περιλαμβάνει την εξάλειψη των ουδετερόφιλων και την αύξηση των μονοπύρηνων στην περιοχή της φλεγμονής.

Η *IL-6* πρέπει να ρυθμίζει αυτήν την διεργασία μέσα από την *επαγωγή της απόπτωσης* των ουδετερόφιλων, της φαγοκυττάρωσης και της στρατολόγησης των μονοπύρηνων. Κατά την διάρκεια της οξείας φλεγμονής ευνοεί την διάλυση του διηθήματος των ουδετερόφιλων και την έναρξη της ανοσολογικής αντίδρασης, ενώ στην χρόνια φλεγμονή αυξάνει την απόπτωση των ουδετερόφιλων, την διήθηση των μονοπύρηνων και την χυμική απόκριση, συμμετέχοντας έτσι στην παθογένεια της νόσου. Στο *ήπαρ*, συμμετέχει στη διέγερση των ηπατικών κυττάρων και επάγει την

έκφραση διαφόρων *γονιδίων πρωτεινών οξείας φάσης*, όπως το *ινωδογόνο* και η **CRP**.

Η χρήση της **IL 6 ως βιοδείκτης φλεγμονής** για την διάγνωση στεατοηπατίτιδας , γίνεται ανεξάρτητα ή σε συνδυασμό με άλλους βιοδείκτες και χρήση μαθηματικών μοντέλων.

Νέα έρευνα[3] που έλαβε μέρος στο *Regional Institute of Gastroenterology and Hepatology*, για την μελέτη παθιοφυσιολογικά βασισμένων βιοδεικτών για την διάγνωση της μη αλκοολικής στεατοηπατίτιδας από την απλή στεάτωση, χρησιμοποίησε 79 ασθενείς εκ των οποίων 50 με NASH και 20 χωρίς NASH και μελέτησε την διαγνωστική αξία της IL 6 .

Η δημιουργία φλεγμονής , είναι το κρίσιμο στάδιο για την εξέλιξη στεατοηπατίτιδας από μια απλή στεάτωση .Στην έρευνα αυτή , βρέθηκε ότι σε ασθενείς με NASH , υπήρξε **5,9 φορές μεγαλύτερη μετάφραση του γονιδίου της ιντερλευκίνης 6** από αυτούς με την απλή στεάτωση .Ο ρόλος της στην παθογένεια της Nash στηρίζεται από τα ανεξάρτητα ευρήματα (αυξημένα IL6 σε NASH) αλλά και υπήρξε και συσχέτιση των αυξημένων αυτών επιπέδων σε συνδυασμό με τα επίπεδα CK18 (M65 αντιγόνο)

Διαγνωστική αξία IL6 , ως μεμονωμένος διαγνωστικός δείκτης NASH

Biomarker	AUC	SE	95%CI	Cut-off value	SE%	SP%	PPV%	NPV%
IL-6 (pg/ml)	0,73	0,06	0,615-0,821	>6	63,7	80,1	90,2	44,7

Συνδυασμός IL 6 και CK18 (M65 αντιγόνο)

Biomarker	AUC	SE	95%CI	SE%	SP%	PPV%	NPV%
M65 + IL-6	0,83	0,05	0,727-0,904	65,2	90,5	95	48,7

TNF α (Tumor Necrosis Factor alpha)

Παράγοντας νέκρωσης όγκου TNF, cachexin ή καχεκτίνη, και παλαιότερα γνωστή ως **παράγοντας νέκρωσης των όγκων άλφα ή TNF α**) είναι μία λιποκίνη που εμπλέκεται στην συστηματική φλεγμονή ,μέλος μιας ομάδας κυτοκινών που διεγείρουν την αντίδραση οξείας φάσης .Παράγεται κυρίως από τα ενεργοποιημένα μακροφάγα .Πρωταρχικός ρόλος είναι η ρύθμιση των κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος .Ο TNFείναι ικανός να επάγει φλεγμονή , αποπτωτικό κυτταρικό θάνατο ,να αναστέλλει την ογκογένεση και την ιική αντιγραφή ενώ ανταποκρίνεται στην σήψη μέσω των κυττάρων που παράγουν IL 6 και IL1 .Παράγεται τις 3 πρώτες μέρες επούλωσης κάποιου τραύματος καθώς προάγει την επιστράτευση των λευκοκυττάρων .Εκτός από τα κύτταρα του ανοσοποιητικού , πολλά άλλα είδη κυττάρων μπορούν να παράξουν TNF α ,συμπεριλαμβανομένων των λιπο-κυττάρων

Ο TNF α , όντας μια **πολύ-λειτουργική** κυτταροκίνη , έχει πάρα πολλές δράσεις, παρόλα αυτά,εμείς θα ασχοληθούμε με την δράση του στην φλεγμονή στα λιποκύτταρα και στην αλληλεπίδραση του με άλλες λιποκυτταροκίνες και τον ρόλο του στην μη αλκοολική λιπώδη νόσο .

Κατέχει βασικό ρόλο στην παθογένεση της NAFLD. Η αύξηση της παραγωγής του από τα ηπατοκύτταρα και τα κύτταρα Kupffer που προκαλείται από το **οξειδωτικό στρές** και τις τοξίνες(λιποπολυσακχαρίτες) που απελευθερώνονται από τα βακτηρίδια του πεπτικού συστήματος ,αυξάνει τα επίπεδα των FFAs, την παραγωγή ελευθέρων ριζών οξυγόνου, καθώς και την απόπτωση των ηπατοκυττάρων. Ο TNF α παρεμβαίνει στην σηματοδότηση της ινσουλίνης(μέσω της φωσφορυλίωσης σε σερίνη του υποστρώματος του υποδοχέα της ινσουλίνης 1 IRS 1 με αποτέλεσμα να την μειώνει και να ευνοεί την στεάτωση έχοντας εξίσου έναν κεντρικό ρόλο στην ανάπτυξη της ηπατικής στεάτωσης και ακολούθως της NASH.

Ανεβασμένα επίπεδα TNF- α σχετίζονται με την **παχυσαρκία** και την ινσουλινοαντίσταση τόσο σε πειραματόζωα όσο και σε ανθρώπους.. Τα επίπεδα του και η ηπατική έκφραση του υποδοχέα του είναι αυξημένα στην NASH.

Η λιπογενετική δράση του λαμβάνει μέρος μέσω της ρύθμισης του από SREBP-1.

Ο TNF α , έχει αρχίσει να διαφαίνεται ότι παίζει ρόλο κλειδί στην παχυσαρκία τον διαβήτη και την δυσλιπιδαιμία οι μηχανισμοί όμως που μεσολαβούν σε αυτές τις δράσεις είναι υπό διερεύνηση .Ρόλο κλειδί φαίνεται να παίζει η **επαγωγή της λεπτίνης** που μεσολαβείτε από τον TNF α .

Τα τελευταία χρόνια η δράση του παράγοντα νέκρωσης των όγκων α ,έχει αποτελέσει στόχο ερευνών , για την θεραπεία της NAFLD,της υπερινσουλιναϊμίας αλλά και της αντίστασης στην ινσουλίνη σε συνδιασμό με στεάτωση του ήπατος

.Προτείνετε ένα μοντέλο με χρήση **μετοφορμίνης** [6]ως θεραπευτικός παράγοντας .Ο μηχανισμός δράσης που μεσολαβεί στην θεραπεία με μετοφορμίνη , είναι η πιθανή αναστολή του παράγοντα νέκρωσης των όγκων και των επαγωγικών αποτελεσμάτων που έχει στην προώθηση της ηπατικής στεάτωσης και νέκρωσης .Συνηθισμένη θεραπευτική τακτική συνιστά την χρήση αναστολέων του TNF α .Η αναστολή αυτή μπορεί να επιτευχθεί με ένα μονοκλωνικό αντίσωμα , η με ένα τροποποιημένο κυκλοφορούν υποδοχέα της πρωτεΐνης .

Ως **προ-φλεγμονώδης κυτοκίνη** , ο *TNF α* έχει γίνει αντικείμενων πολλών ερευνών για την χρήση του ως βιοδείκτης στην *NAFLD* αλλά και στην διάγνωση στεατοηπατίτιδας και ίνωσης .

Μελέτες μη επεμβατικής διάγνωσης της στεατοηπατίτιδας ,έχουν ανακαλύψει σημαντικά αυξημένα επίπεδα του TNF α και του υποδοχέα του (sTNFR1) στον ορό ασθενών με NASH σε σχέση με αυτών με απλή στεάτωση .

Σε πρόσφατη μελέτη [5]του mRNA του TNFα σε 39 ασθενείς με NASH , με χρήση real time reverse transcriptase PCR , βρέθηκε ότι ο μέσος όρος mRNA του TNFα , ήταν σημαντικά υψηλότερος στους ασθενείς από τα κοντρόλ .

137.6 ± 102.3 ng/mL σε αντίθεση με 83.5 ± 43.8 ng/mL, αντίστοιχα P = 0.012)

Προτείνεται το *TNF-α mRNA* ως βιοδείκτης με **όριο αποκοπής τα 100 ng/mL** ότι προβλέπει τη NASH (AUC 0.685 ± 0.066, P = 0.01; με **66.7% ευαισθησία** και **74.1% ειδικότητα**).

Λεπτίνη

Η **λεπτίνη** είναι μία λιποκίνη που ρυθμίζει την **ενεργειακή πρόσληψη**, συμπεριλαμβανομένης της όρεξης, της πείνας, του μεταβολισμού και της συμπεριφοράς. Η κλωνοποίηση του ob γονιδίου ανθρώπου και ποντικού το 1994 οδήγησε στην ανακάλυψη ότι κωδικοποιούσε μια 16 kDa πρωτεΐνη, η οποία ονομάστηκε ob πρωτεΐνη ή λεπτίνη (από την ελληνική λέξη «λεπτός») Το επίπεδο του ob mRNA στο λευκό λιπώδη ιστό και η συγκέντρωση της κυκλοφορούσας λεπτίνης αυξάνονται αξιοσημείωτα στην παχυσαρκία, όπως φαίνεται από μελέτες σε ανθρώπους και αρκετά είδη παχύσαρκων ζώων . Πράγματι, στους ανθρώπους παρατηρείται υψηλή συσχέτιση ανάμεσα στο δείκτη μάζας-σώματος και την κυκλοφορούσα λεπτίνη. Επομένως, όσο μεγαλύτερο είναι το ποσοστό του λιπώδους

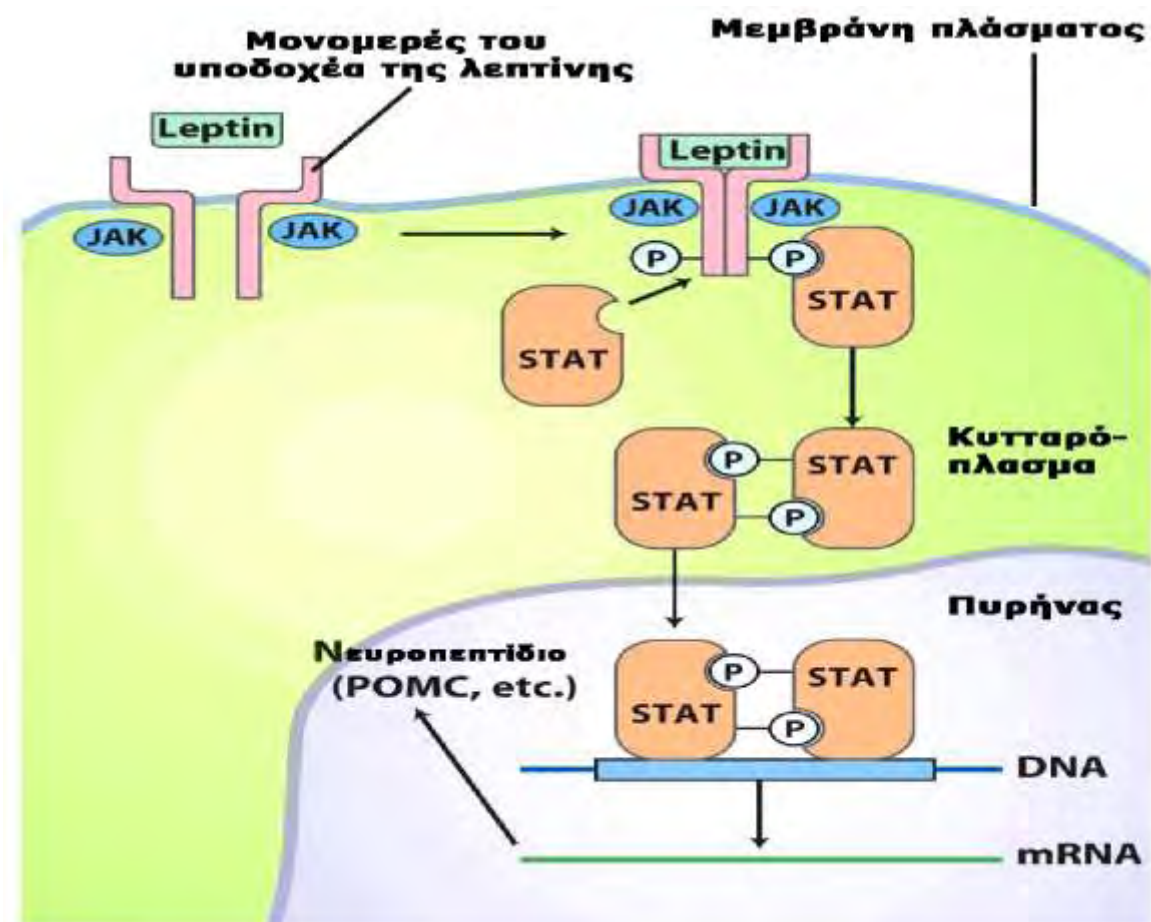
ιστού, τόσο υψηλότερο είναι το επίπεδο της ορμόνης. Επιπλέον, όπως έχει προαναφερθεί, το μέγεθος των λιποκυττάρων φαίνεται να είναι άλλος ένας μείζων καθοριστικός παράγοντας της έκφρασης του γονιδίου της λεπτίνης. Έχουν ταυτοποιηθεί και χαρακτηριστεί κλινικά, άτομα με ε οξεία και πρώιμη παχυσαρκία, εξαιτίας της αδρανοποιητικής μετάλλαξης στο γονίδιο της λεπτίνης όμως αρκετές μελέτες πληθυσμών έχουν αποτύχει να εντοπίσουν αυτές τις μεταλλάξεις.

Η λεπτίνη παράγεται στο ήπαρ και συμμετέχει στο μεταβολισμό των λιπιδίων, εμποδίζει την συσσώρευση λίπους στα όργανα, αναστέλλοντας την λιπογένεση και αυξάνοντας την λιπόλυση, μετά την πρόσληψη περίσσειας θερμίδων. σε γενετικές παθήσεις όπως λιποδυστροφίες, παρατηρείται μειωμένη ευαισθησία ή απουσία δράσης της λεπτίνης. Στους ασθενείς αυτούς δεν αναπτύσσεται ο λιπώδης ιστός και το λίπος συσσωρεύεται σε όργανα όπως το ήπαρ προκαλώντας αύξηση στην αντίσταση στην ινσουλίνη. Εκτός από την πρόσληψη τροφής και την κατανάλωση ενέργειας, η λεπτίνη συσχετίζεται με τη δράση της ινσουλίνης και την επούλωση των τραυμάτων. Επίσης, τα αστεροειδή κύτταρα εκφράζουν υποδοχείς λεπτίνης, ενώ η έκθεση στην πρωτεΐνη αυτή οδηγεί σε παραγωγή του αυξητικού παράγοντα του συνδετικού ιστού TGF-β (transforming growth factor-β) και σε ινογένεση.^{24,25} Έτσι, ο TGF-β αυξάνεται σε καλλιέργεια αστεροειδών κυττάρων που έχουν ειδικούς υποδοχείς ινσουλίνης. Ωστόσο τα υπάρχοντα κλινικά δεδομένα για την δράση της λεπτίνης στην Nafld είναι αντικρουόμενα.

Σε έρευνα [7] που δημοσιεύτηκε το 2010 για την διερεύνηση της πιθανής χρήσης της λεπτίνης και της αδιπονεκτίνης ως βιοδείκτες για την διάγνωση της NAFLD, τα αποτελέσματα όσον αφορά την λεπτίνη δεν ήταν ενθαρρυντικά. Μελετήθηκαν 39 ασθενείς με nafld και 15 από υγιή πληθυσμό με μέσο όρο ηλικίας 38.00 ± 10.42 και δεν βρέθηκε μια ικανοποιητική διαφορά στα επιπεδά της, που θα την καταστήσει χρήσιμη ως δείκτη.

Πίνακας 4 :[7] επίπεδα λεπτίνης ng/ml, σε ασθενείς με Nafld και σε Control.

	Control (n15)	Nafld (n39)
Λεπτίνη (ng/ml)	8.16 ± 2.14	8.91 ± 1.72



Εικόνα 5: η λεπτίνη, ο υποδοχέας της λεπτίνης και η δράση της μέσω του μονοπατιού των Jak/Stat κινασών .

Τα αποτελέσματα νεων μελετων τα οποία είναι ελπιδοφόρα για την χρήση της λεπτίνης ως βιοδείκτη παραβρίσκονται κάτωθεν :

[6] Σε έρευνα που έγινε με χρήση με επεμβατικών μεθόδων με βιοδεικτών και συνδυασμών βιοδεικτών για την διάγνωση στεατοηπατίτιδας και ίνωσης σε παιδιά , η λεπτίνη βρέθηκε να είναι ένα χρήσιμο διαγνωστικό εργαλείο .Φάνηκε ότι μπορεί να ξεχωρίσει τα παιδιά με ελάχιστη ίνωση από αυτά με σημαντική ίνωση .

{ ελάχιστη ίνωση : μέσος όρος 28.9 ng / mL }

{ σημαντική ίνωση : μέσος όρος $70,1 \text{ ng / mL}$ }

($P = 0,037$).

αδιπονεκτίνη

Η **αδιπονεκτίνη** είναι μια ορμόνη που εμπλέκεται στη ρύθμιση των επιπέδων της γλυκόζης, όπως επίσης και στον καταβολισμό των λιπαρών οξέων. Η ορμόνη αυτή εκκρίνεται αποκλειστικά από τον λιπώδη ιστό (και από τον πλακούντα σε περίπτωση εγκυμοσύνης) στην κυκλοφορία του αίματος. Τα επίπεδα της ορμόνης στο αίμα συνδέονται σε μεγάλο βαθμό με το ποσοστό σωματικού λίπους στα ενήλικα άτομα. Η αδιπονεκτίνη παίζει ρόλο στην καταστολή των μεταβολικών διαταραχών που μπορεί να είναι αποτέλεσμα στις περιπτώσεις του διαβήτη τύπου 2, της παχυσαρκίας, της αθηροσκλήρωσης και άλλων μεταβολικών συνδρόμων.

Η αδιπονεκτίνη σε φυσιολογικού βάρους ενήλικες παράγεται σε μεγάλα ποσά από τα διαφοροποιημένα λιποκύτταρα, κυρίως του υποδόριου λίπους συγκριτικά με το σπλαχνικό. Υπάρχουν 2 τύποι του υποδοχέα της αδιπονεκτίνης: ο τύπος 1 εκφράζεται κυρίως στους μυς και ο τύπος 2 στο ήπαρ. Έχει διαπιστωθεί ότι σε κεντρικού τύπου παχυσαρκία τα επίπεδα της στο πλάσμα είναι σημαντικά ελαττωμένα και εμφανίζουν αρνητική συσχέτιση με την αντίσταση στη δράση της ινσουλίνης. ευρήματα που υποδηλώνουν ότι **η ελάττωσή της συμβάλλει στην παθογένεια αυτών των καταστάσεων**. Στον άνθρωπο διαπιστώθηκαν χαμηλά επίπεδα αδιπονεκτίνης σε κεντρικού τύπου παχυσαρκία, Σακχαρώδη Διαβήτη 2, σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών, υπερινσουλιναιμία και αυξημένα επίπεδα σε Σακχαρώδη Διαβήτη 1, χρόνια νεφρική ανεπάρκεια, νευρογενή ανορεξία και με τη χορήγηση αναστολέων του μετατρεπτικού ενζύμου. Μελέτες σε πειραματόζωα και στον άνθρωπο έδειξαν συσχέτιση μεταξύ αδιπονεκτίνης και λειτουργίας του ενδοθηλίου. Ενδεικτικά αναφέρονται: αύξηση αγγειοδιαστολής, ελάττωση της σύνθεσης προσκολλητικών μορίων, καταστολή της δράσης του TNF-α στη λειτουργία του ενδοθηλίου, αυξημένη παραγωγή μονοξειδίου του αζώτου (NO) κ.α. Επιπλέον, η αδιπονεκτίνη αυξάνει την ευαισθησία των ιστών στην ινσουλίνη. Χορήγηση αδιπονεκτίνης στα τρωκτικά προκαλεί αύξηση της πρόσληψης γλυκόζης και της οξείδωσης των λιπών στους μυς, ελάττωση της παραγωγής γλυκόζης στο ήπαρ και βελτιώνει σημαντικά τη δράση της ινσουλίνης. Φαίνεται, λοιπόν, ότι πρόκειται για μια μοναδική ορμόνη του λιπώδους ιστού με αντιδιαβητική και αντιαθερογόνο δράση. Η σημαντικές τις αυτές λειτουργίες και τα χαμηλά της επίπεδα σε παχύσαρκους και ασθενείς με διαβήτη τύπου 2, οδήγησαν στην έρευνα και χρήση της ως βιοδείκτη στην NAFLD.

Ασθενείς με Nafld, έχουν σημαντικά χαμηλότερα επίπεδα αδιπονεκτίνης και ο συνδυασμός χρήσης της με άλλους βιοδείκτες φλεγμονής, προσφέρει καλά αποτελέσματα διάγνωσης.

CRP

Η C αντιδρώσα πρωτεΐνη (CRP) , είναι μία δακτυλιοειδής πενταμερής πρωτεΐνη του πλάσματος , τα επίπεδα της οποίας ανεβαίνουν σε απάντηση στην φλεγμονή (πρωτεΐνη οξείας φάσης).Ο φυσιολογικός της ρόλος είναι να συνδέεται στην φωσφοχολίνη που εκφράζεται στην επιφάνεια νεκρών ή ετοιμοθάνατων κυττάρων,και μερικών τύπων βακτηρίων με σκοπό την ενεργοποίηση του συστήματος συμπληρώματος,μέσω του συμπλόκου c1q.

Η ενεργοποίηση του συμπληρώματος από την CRP προωθεί την φαγοκυττάρωση από τα μακροφάγα , που καθαρίζει νεκρά και αποπτωτικά κύτταρα και βακτήρια , ενώ η σύνθεση της στο ήπαρ γίνεται σε απάντηση απο παράγοντες που εκκρίνουν τα μακροφάγα όπως και τα λιποκύτταρα.

Οι απαντήσεις'οξείας φάσης , είναι αποτέλεσμα της αύξησης της συγκέντρωσης της IL 6 που παράγεται και αυτή από τα λιποκύτταρα και τα μακροφάγα σε απάντηση σε ένα μεγάλο εύρος χρόνιων φλεγμονωδών καταστάσεων όπως νέκρωση και τραυματισμός ιστών και οργάνων , μόλυνση από βακτήρια , ιούς και μύκητες ρευματοειδής και άλλες φλεγμονώδεις καταστάσεις όπως η στεατοηπατίτιδα.Τελικά η έκκριση ιντερλευκίνης 6 και άλλων κιτοκινών προωθούν την σύνθεση της CRP .

Η κύρια διαγνωστική χρήση της , είναι ως δείκτης φλεγμονής και ηπατικής δυσλειτουργίας .Η μέτρηση των επιπέδων της μπορεί να αποδειχθεί χρήσιμη για τον προσδιορισμό της προόδου της νόσου ή την αποτελεσματικότητα των θεραπειών. Η μέτρηση μπορεί να γίνει με πολλές μεθόδους όπως elisa , ταχεία ανοσοδιάχυση και νεφελομετρία .

Εκτός από το απλό τεστ CRP που είναι πλέον εξέταση ρουτίνας και χρησιμοποιείται ευρέως ως δείκτης φλεγμονής σε όλες τις εκφάνσεις της μη αλκοολικής λιπώδης νόσου, έχει αρχίσει ερευνητικά να χρησιμοποιείται και υψηλής ευαισθησίας τεστ high sensitivity CRP μετρά πολύ χαμηλά επίπεδα CRP με τη χρήση νεφελομετρίας με λέιζερ.Η δοκιμή δίνει τα αποτελέσματα σε 25 λεπτά με μια ευαισθησία που φτάνει να μετρά επίπεδα κάτω των 0.04 mg / L.

Η φυσιολογικές συγκεντρώσεις σε έναν υγιή άνθρωπο είναι συνήθως χαμηλότερη απο 10mg/L και αυξάνονται ελαφρώς με το γήρας .Σε ήπια φλεγμονή και ιογενής λοιμώξεις τα επίπεδα φτάνουν τα 10-40mg/L ενώ σε μια ενεργή φλεγμονή ή μια βακτηριακή λοίμωξη φτάνουν τα 200mg/L.Ακόμα μεγαλύτερα επίπεδα πάνω από 200mg/L εμφανίζονται σε όσους έχουν υποστεί εγκαύματα .

Η μέτρηση hsCRP γίνεται συνήθως για να μετρηθούν τα επίπεδα της σε υγιείς ανθρώπους με σκοπό την εκτίμηση του κινδύνου για καρδιαγγειακές παθήσεις και μέχρι τώρα είναι ευρέως αποδεκτό ότι δεν χρησιμοποιείται αυτό το τεστ σε άτομα με χρόνιες φλεγμονώδεις νόσους , γιατί σε αυτούς τα επίπεδα θα ήταν ήδη υψηλά .

Ωστόσο τα τελευταία χρόνια , το τεστ αυτό σε συνδυασμό με άλλους βιοδείκτες , η και μόνο του χρησιμοποιείται ως ανεξάρτητος της παχυσαρκίας δείκτης της σοβαρότητας της nafld και κυρίως της μη αλκοολικής στεατοηπατίτιδας .

[13]Σε έρευνα που έγινε με σκοπό να συσχετίσει τα επίπεδα της CRP με άλλα χαρακτηριστικά της μη αλκοολικής λιπώδη νόσου του ήπατος σε 627 παχύσαρκους ανθρώπους , βρέθηκε άμεση συσχέτιση των επιπέδων hsCRP και του BMI .Για κάθε 10 % αύξηση του BMI τα επίπεδα της hsCRP αυξάνονταν 17-20%.Υπήρξε μία σαφής συσχέτιση των επιπέδων της σε ασθενείς με Nash.Η έρευνα αυτή προτείνει ότι η hsCRP είναι δείκτης στεάτωσης αλλά όχι της σοβαρότητας της Nafld σε ήδη παχύσαρκους , γιατί όπως φαίνεται η παχυσαρκία από μόνη της ανεβάζει τα επίπεδα .

Ο Σίδηρος (Fe^+)

Το σύνδρομο υπερφόρτωσης και δυσ-μεταβολισμού του σιδήρου (DIOS) και η εναπόθεσή του στα ηπατικά κύτταρα , έχει ανακαλυφθεί στο ένα τρίτο των ασθενών με Nafld και μεταβολικό σύνδρομο .Πρόσφατες έρευνες έχουν δείξει ότι υπερφόρτωση με σίδηρο ενός κίρρωτικού απο NASH ηπατικού παρεγχύματος φαίνεται να συνδέεται με αυξημένες πιθανότητες ηπατικού καρκίνου.

Το πολύ συχνό εύρημα της υπερφόρτωση σιδήρου σε ασθενής με NAFLD , έχει οδηγήσει στην χρήση του ως βιοδείκτη αλλά συνάμα γίνεται δοκιμή του σε θεραπευτικές μελέτες της νόσου .

Fe^+

Ο Fe είναι στοιχείο απαραίτητο για την επιβίωση όλων των έμβιων όντων. Εκτός από τον κύριο ρόλο του στη μεταφορά και αποθήκευση του οξυγόνου, συμμετέχει σε πλήθος άλλων βιοχημικών διεργασιών, όπως η μεταφορά ηλεκτρονίων στα μιτοχόνδρια, ο μεταβολισμός κατεχολαμινών και η άμυνα του οργανισμού. Για την εξασφάλιση του φυσιολογικού ρυθμού ερυθροποίησης απαιτείται ίση ποσότητα Fe με αυτή που χάνεται από τα αποπίπτοντα ερυθρά. Η ημερήσια παραγωγή ερυθρών είναι περίπου 200×10^9 , για την επαρκή αιμοσφαιρινοποίηση των οποίων απαιτούνται 20-30mg Fe 1.

Πρωτεΐνες μεταφοράς και αποθήκευσης σιδήρου

Ο Fe, λόγω της ικανότητας του να προσλαμβάνει και να αποδίδει ηλεκτρόνια, αναλόγως της τιμής του PH, μπορεί να προκαλέσει στην “ελεύθερη”, οξειδωμένη μορφή του σοβαρές κυτταρικές βλάβες. Για το λόγο αυτό βρίσκεται πάντοτε συνδεδεμένος με διάφορες πρωτεΐνες μεταφοράς και αποθήκευσης. Η φερριτίνη είναι η κύρια πρωτεΐνη αποθήκευσης του Fe, η οποία συμβάλλει στην ελεγχόμενη απελευθέρωσή του και στην προστασία του από την οξείδωση. Παράγεται από τα κύτταρα του ΔΕΣ στο ήπαρ, σπλήνα και μυελό των οστών και το ερέθισμα για τη σύνθεσή της είναι ο Fe.

Η φερριτίνη έχει σφαιρική δομή με διάμετρο 12-13nm, αποτελούμενη από το

υδατοδιαλυτό σύμπλεγμα της αποφερριτίνης και το Fe. Η αποφερριτίνη σχηματίζει ένα κέλυφος που αποτελείται από 24 υπομονάδες, H (Heavy) και L (Light), οι οποίες είναι διπλωμένες σε δέσμες 4 ελίκων. Η υδρόφοβη κεντρική κοιλότητα του μορίου με διάμετρο 7-8nm είναι η περιοχή αποθήκευσης του Fe 3+ (ferric state) και μπορεί να περιέχει μέχρι 4.500 άτομα Fe. Ο μηχανισμός διακίνησης του Fe στο μόριο της φερριτίνης δεν έχει αποσαφηνιστεί. Θεωρείται ότι εισέρχεται μέσω έξι υδρόφιλων διαύλων σαν Fe 2+ (ferrous state), στη συνέχεια οξειδώνεται σε Fe 3+ και έτσι παραμένει αποθηκευμένος. Όταν ο οργανισμός χρειάζεται Fe, τότε ανάγεται με τη βοήθεια του ασκορβικού και διυδροφουμαρικού οξέος και εξέρχεται του μορίου 4.

Η αιμοσιδηρίνη είναι πρωτεΐνη αδιάλυτη στο νερό και ορατή στο μικροσκόπιο με τη χρώση Prussian blue (αντίδραση Perl's). Σε παθολογικές καταστάσεις υπερφόρτωσης με Fe, ο πλεονάζων Fe, αποθηκεύεται στην αιμοσιδηρίνη. Έχει μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε Fe σε σχέση με τη φερριτίνη και προκύπτει από την αποδόμηση του περιβλήματος της φερριτίνης στα λυσοσωμάτα. Βρίσκεται κυρίως στα μακροφάγα και σε καταστάσεις υπερφόρτωσης σε Fe απαντά σε υψηλή συγκέντρωση και στα ηπατοκύτταρα.

Η τρανσφερρίνη (TF) είναι γλυκοπρωτεΐνη-μεταφορέας του Fe αποτελούμενη από μία πολυπεπτιδική αλυσίδα και βρίσκεται στο πλάσμα και στα υγρά του εξωαγγειακού χώρου. Παράγεται κυρίως στο ήπαρ και η σύνθεσή της είναι αντιστρόφως ανάλογη των αποθηκών Fe. Σε κάθε μόριο της πρωτεΐνης προσδένονται δύο άτομα Fe 3+ ή διαφορετικά 4mg του συνολικού Fe του ορού βρίσκονται με τη μορφή TF. Η TF που δεν είναι συνδεδεμένη με το Fe ονομάζεται απο-τρανσφερρίνη. Η πρόσληψη του Fe από τα κύτταρα γίνεται μέσω του υποδοχέα της TF, TFR1. Πρόκειται για μία διαμεμβρανική πρωτεΐνη με δύο υπομονάδες, σε καθεμία από τις οποίες συνδέεται ένα μόριο TF. Μετά την ενδοκύττωση του συμπλόκου [Fe-TF-TFR1], ο Fe απελευθερώνεται λόγω του όξινου pH στο εσωτερικό των ενδοσωματίων, ανάγεται με τη βοήθεια μιας ρεδοκτάσης (Steap3) και εξέρχεται στο κυτταρόπλασμα μέσω της DMT1. Η TF με τον TFR επιστρέφουν στην επιφάνεια του κυττάρου και επαναχρησιμοποιούνται σε νέο κύκλο. Ο Fe στο κυτταρόπλασμα αποθηκεύεται ή χρησιμοποιείται για τη σύνθεση της αίμης και άλλων πρωτεϊνών. Ο υποδοχέας TFR2 συμμετέχει στο μηχανισμό ομοιόστασης του Fe και στη ρύθμιση της έκκρισης της ενβιδίνης 5.

Η ομοιόσταση του σιδήρου σε κυτταρικό επίπεδο

Η πρόσληψη Fe μέσω του TFR, η ενδοκυττάρια αποθήκευσή του στη φερριτίνη και η ενσωμάτωση του στην αίμη συντονίζονται στο επίπεδο της μεταγραφής και της μετάφρασης με βάση τις απαιτήσεις του οργανισμού σε Fe. Αυτό πραγματοποιείται με την παρουσία ειδικών αλληλουχιών απάντησης στο Fe (iron responsive elements, IREs), που εντοπίζονται σε περιοχές του αγγελιοφόρου mRNA για τη φερριτίνη, τη συνθετάση του δ-αμινολεβουλινικού οξέος (aminolaevulinic acid

synthetase, ALA-S) και τον TFR. Τα ένζυμα αυτά, που εμπλέκονται στο μεταβολισμό του Fe, ρυθμίζονται σε επίπεδο μετάφρασης του RNA από τις ρυθμιστικές πρωτεΐνες του κυτταροπλασματικού δικτύου (cytoplasmic iron regulatory proteins, IRPs). Σε περίσσεια Fe οι IRPs εμφανίζουν χαμηλή συγγένεια για τα IRE, οδηγώντας σε μειωμένη σύνθεση υποδοχέα TFR (αναστολή της μετάφρασης) αλλά σε αύξηση της σύνθεσης φερριτίνης και ALA-S των ερυθρών (ευόδωση της μετάφρασης). Αντιθέτως, σε έλλειμμα Fe, η σύνδεση IRP-IRE είναι αυξημένη, οδηγώντας σε αύξηση των TFR και μείωση των επιπέδων της φερριτίνης και της ALA-S 6. Στον πίνακα 1 αναφέρονται συνοπτικά οι κυριότερες πρωτεΐνες που συμμετέχουν στον μεταβολισμό και στην ομοιόσταση του Fe 2.

Η φερροπορτίνη είναι μία πρωτεΐνη-μεταφορέας Fe προς το εξωτερικό του κυττάρου και εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα στα εντεροκύτταρα του δωδεκαδακτύλου, στα συγκλητιοτροφοβλαστικά κύτταρα του πλακούντα, στα μακροφάγα και στα ηπατοκύτταρα. Η φερροπορτίνη με τη βοήθεια μιας φερροξειδάσης (εφεστίνη στα εντεροκύτταρα και σερούλοπλασμίνη στα μακροφάγα) μεταφέρει τον Fe 3+ στην TF του πλάσματος.

Πρόσφατες μελέτες προτείνουν ότι η εσιδίνη του αίματος αλληλεπιδρά με τα λαχνωτά εντεροκύτταρα και ρυθμίζει το ρυθμό απορρόφησης του Fe με έλεγχο της έκφρασης της φερροπορτίνης στην πλαγιοβασική μεμβράνη. Η σύνδεση της εσιδίνης με τη φερροπορτίνη οδηγεί στην εγκόλπωση και στην αποικοδόμηση της τελευταίας στα λυσοσωμάτια. Σε φλεγμονώδεις καταστάσεις ή όταν τα επίπεδα Fe είναι επαρκή ή υψηλά, το ήπαρ παράγει εσιδίνη, η οποία κυκλοφορεί στο λεπτό έντερο και προκαλεί την εγκόλπωση της φερροπορτίνης, εμποδίζοντας τη μεταφορά του Fe στο πλάσμα. Όταν τα επίπεδα Fe είναι χαμηλά, η παραγωγή εσιδίνης καταστέλλεται, οπότε τα μόρια φερροπορτίνης και η απορρόφηση του Fe αυξάνονται. Επιπλέον, η αλληλεπίδραση εσιδίνης-φερροπορτίνης εξηγεί τη ρύθμιση της ανακύκλωσης του Fe στα μακροφάγα. Όταν τα επίπεδα εσιδίνης είναι υψηλά, η εξαγωγή Fe από τα μακροφάγα αναστέλλεται και έτσι εγκλωβίζεται στα μακροφάγα κυρίως του σπληνός 7,8,9.

Η άμεση αλληλεπίδραση της εσιδίνης με τη φερροπορτίνη πιθανώς δεν είναι η μοναδική οδός ρύθμισης της συγκέντρωσης των μορίων της φερροπορτίνης στην κυτταρική μεμβράνη. Υπάρχουν δεδομένα ότι τα επίπεδα mRNA της φερροπορτίνης ρυθμίζονται από το Fe καθαυτό και η εσιδίνη ίσως να έχει δευτερεύοντα ρόλο στην κυτταρική πρόσληψη Fe μέσω αύξησης του ενδοκυττάριου Fe στα εντεροκύτταρα, στα μακροφάγα ή στα ηπατοκύτταρα 11.

Σε έρευνα (2) που έγινε για την ανακάλυψη των μηχανισμών που ενέχονται στην συσσώρευση σιδήρου σε ασθενείς με μη αλκοολική λιπώδη νόσο, μελετήθηκαν ασθενείς με Nafld με και χωρίς υπερφόρτωση σιδήρου και έγινε η σύγκριση τους με υγιείς. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι οι ασθενείς με υπερφόρτωση ήταν μεγαλύτεροι σε ηλικία από αυτούς που ο σίδηρος ήταν φυσιολογικός, ενώ και οι δύο κατηγορίες ασθενών δεν είχαν διαφορετικά BMI, τρανσαμινάσες ήπατος, τριγλυκερίδια και

χοληστερόλη .Ωστόσο, οι ασθενείς με NAFLD και υπερφόρτωση σιδήρου είχαν σημαντικά υψηλότερες συγκεντρώσεις γλυκόζης νηστείας. Εκτός από έχοντας μια υψηλότερη HIC και υψηλότερο βαθμό σιδήρωσης, οι ασθενείς NAFLD με υπερφόρτωση σιδήρου είχαν επίσης σημαντικά υψηλότερες συγκεντρώσεις φερριτίνης ορού και του κορεσμού τρανσφερίνης από ασθενείς NAFLD χωρίς υπερφόρτωση σιδήρου .

Σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου , τα επίπεδα του μόριου αισθητήρα σιδήρου στο ήπαρ ήν ήταν σημαντικά χαμηλότερα σε ασθενείς με Nafld και ακόμα χαμηλότερα σε αυτούς με υπερφόρτωση σιδήρου όπως επίσης και η ηπατική έκφραση του mRNA του TfR-1 .Αντίθετα το mRNA του γονιδίου της επιδίνης ήταν σε πολύ υψηλότερα επίπεδα σε αυτούς με υπερφόρτωση , από τους ασθενείς χωρίς και από τα κοντρόλ .

Τέλος ηπατική έκφραση του TNF-α ήταν υψηλότερη σε ασθενείς με NAFLD σε σχέση με τους ελέγχους, με περαιτέρω αύξηση σε NAFLD με υπερφόρτωση σιδήρου (η κυτοκίνη αυτή είναι αυξημένη στα άτομα με παχυσαρκία και με NAFLD και είναι γνωστή η διαμεσολάβηση της στην ρύθμιση της ομοιόστασης του σιδήρου .)

ΒΙΟΔΕΙΚΤΕΣ ΑΠΟΠΤΩΣΗΣ

Η παθολογική αύξηση της κυτταρικής απόπτωσης στο ήπαρ καθώς και σε περιφερικούς ιστούς έχει αναδειχθεί ως ένα σημαντικός μηχανισμός που εμπλέκεται στην ανάπτυξη και την εξέλιξη της μη αλκοολική λιπώδης νόσος του ήπατος (NAFLD). Σημαντική αύξηση στον κυτταρικό θάνατο με απόπτωση των ηπατοκυττάρων είναι τυπικά παρούσα σε ασθενείς με Nafld και σε πειραματικά μοντέλα στεατοηπατίτιδας ενώ η αύξηση της απόπτωσης των λιποκυττάρων του σπλαχνικού λιπώδους ιστού μπορεί να είναι ένας σημαντικός μηχανισμός που ενεργοποιεί την αντίσταση στην ινσουλίνη και την ηπατική στεάτωση. Υπεύθυνα φαίνεται να είναι τα δύο θεμελιώδη μονοπάτια απόπτωσης ,το εξωγενές (θάνατος που διαμεσολαβείτε από υποδοχείς) και με το εγγενές(μέσω οργανιδίων).

Η απόπτωση είναι μια καλά οργανωμένη , γενετικά καθορισμένη μορφή κυτταρικού θανάτου .Κατά την διάρκεια της,τα κύτταρα είναι κατακερματισμένα σε μικρά αποπτωτικά σώματα ενωμένα με την μεμβράνη που περιέχουν θραύσματα dna και πρωτεϊνών .Τα αποπτωτικά σώματα καλούνται και φαγοσώματα .

Το εξωγενές μονοπάτι,διαμεσολαβείτε από υποδοχείς θανάτου, που περιλαμβάνουν, τον fas, τον υποδοχέα του TNF 1 , και τον σχετιζόμενο με την απόπτωση , επαγωγικό υποδοχέα του TNF (TRIAL).Οι φυσικοί προσδέτες τους , επάγουν ενδοκυτταρικά μονοπάτια που επάγουν τον κυτταρικό θάνατο, ενεργοποιώντας πρωτεολυτικά ένζυμα ,κυρίως κασπάσες .

Το **ενδογενές μονοπάτι** , περιλαμβάνει πολλά **οργανίδια** .Απόπτωση μπορεί να ξεκινήσει από **δυσλειτουργία των μιτοχονδρίων** , από **διαπερατότητα των λυσοσωμάτων** , **στρες** του **ενδοπλασματικού δικτύου** και **βλάβη του πυρηνικού**

DNA

Στα κύτταρα του ήπατος , δυσλειτουργία των μιτοχονδρίων , παίζει τον πιο σημαντικό ρόλο στην αύξηση του αποπτωτικού σήματος με το να διασταυρώνει και τα δύο αποπτωτικά μονοπάτια σε ένα .Αποτέλεσμα της δυσλειτουργίας αυτής , είναι η απελευθέρωσή πολλών προ αποπτωτικών πρωτεϊνών στο κυτοσόλιο , συμπεριλαμβανομένου του κυτοχρώματος C που δημιουργεί ένα σύμπλεγμα ενεργοποίησης με τον αποπτωτικό παράγοντα ενεργοποίησης apaf 1 και την κασπάση 9 γνωστό ως αποπτώσωμα . Αυτό το σύμπλεγμα τότε ενεργοποιεί τις κασπάσες 3 , 6 και 7 που εκτελούν τις τελευταίες αλλαγές για την απόπτωση .Τα μιτοχονδιακά γεγονότα ρυθμίζονται από την οικογένεια πρωτεϊνών Bcl 2 που περιλαμβάνει τουλάχιστον 20 μέλη που περιέχουν διαφόρου βαθμού ομολογία με τις 4 περιοχές BH1-4 domains .Ο ρόλος του λυσοσώματος στην απόπτωση διαμεσολαβεί κυρίως από την Καθεψίνη β , μια λυσοσωμική πρωτεάση που απελευθερώνεται απο αυτά κατά την διάρκεια σηματοδότησης από τον TNF α , αυτό οδηγεί σε μιτοχονδριακή δυσλειτουργία και απελευθέρωσή του κυτοχρώματος c .

Οι τελεστές της απόπτωσης , οι κασπάσες δηλαδή και κυρίως η 3 , κόβουν διάφορα υποστώματα μέσα στο κύτταρο , συμπεριλαμβανομένης και της κυτοκερατίνης 18 CK 18 που είναι η κύρια πρωτεΐνη των ενδιάμεσων ινιδίων του ήπατος .

Η κασπάση 3 , κόβει την CK 18 , στον N τελικό άκρο σε μία asp 237 και στο C τελικό ακρό σε μία Asp 398.Αυτά τα κομμάτια και όχι όλη η CK 18 μπορούν να ανιχνευτούν με μονοκλωνικά αντισώματα M30 τόσο στο ήπαρ όσο και στο αίμα .Χρήση της CK 18 ως βιοδείκτη με ανοσοενζυμική μέθοδο Elisa έχει ως σκοπό να ξεχωρίσει τους ασθενείς με NASH από αυτούς με μία απλή στεάτωση και από εκείνους με υγιές ήπαρ .

Η έρευνα που δημοσιεύτηκε τον Απρίλιο του 2011 [10] με επικεφαλής τον ερευνητή Ariel E Feldstein έδειξε ότι ασθενείς με NASH έχουν πολύ υψηλότερα ποσά CK 18 στο ορό από αυτούς με απλή στεάτωση και από τους υγιείς .Τα αποτελέσματα των ερευνών είναι ενθαρρυντικά με καμπύλη ROC ανάμεσα 0,71 0,93 .Η ικανότητα της CK 18 έχει επικυρωθεί σε μία πολυσχιδή μελέτη στην οποία προτείνεται ότι για κάθε 50 U/L αύξηση της στο πλάσμα η πιθανότητα του να έχει κάποιος NASH από απλή στεάτωση αυξάνεται κατά 74% .Οι ίδιοι οι ερευνητές επικαλούνται ότι το τεστ για την CK 18 έχει όλα τα χαρακτηριστικά του ιδανικού βιοδείκτη για την Nafld, όντας παραγωγικό απλό και εύκολο στην μέτρηση.

Η ίδια έρευνα του Ariel E Feldstein και της ομάδας του προτείνει και την χρήση των επιπέδων του διαλυτού Fas και FasL στον ορό ως βιοδείκτη απόπτωσης για την διάγνωση NASH .

Μελέτη	Πληθυσμός	Ασθενείς	AUC	Sensitivity(%)	Specificity(%)
Wieckowska et al (2006)	Ασθενείς(μία κλινική)	44	0,93	86	99.9
Yilmaz.et al(2007)	Ασθενείς(μία κλινική)	83	0,83	62	100
Diab.et al(2008)	Ασθενείς(χειρουργική κλινική)	99	0,88	77	100
Malik.et al(2009)	Ασθενείς(μία κλινική)	95	0,8	-	-
Younossi.et al(2008)	Ασθενείς (νοσηρά παχύσαρκοι)	101	0,71	70	84
Feldstein.et al(2009)	Ασθενείς(πολλές απλές κλινικές)	139	0,83	75	81
Fitzpatrick.et al(2010)	Ασθενείς(παιδιά)	45	0,85	84	88
Musso.et al(2010)	Ασθενείς(μία κλινική)	125	0,83	78	88
Anty.et al(2010)	Νοσηρά παχύσαρκοι ασθενείς(Nice model)	310(training) 154(validation)	0,88 0,84	84 -	86 -

Πίνακας 5[10] Βιοδείκτης CK18 ~ακρίβεια πρόβλεψης μη αλκοολικής στεατοηπατίτιδας

Παρόλα αυτά , νεότερη δημοσίευση [12] που περιγράφει την μελέτη που έγινε για την εκτίμηση των αποτελεσμάτων του Feldstein και της ομάδας του , επικαλείται ότι το τεστ επιπέδων CK18 , κρίνεται ανεπαρκής ως μοναδικός βιοδείκτης για την στεατοηπατίτιδα και την ίνωση. Δηλαδή ότι η διαγνωστική αξία είναι πύο περιορισμένη από ότι έλεγαν οι ερευνητές .Συγκεκριμένα , στην δική τους έρευνα για εκτίμηση της CK 18 ως βιοδείκτη πήραν τα εξής αποτελέσματα :

Prediction	AUROC	Sensitivity	Specificity
Nafld	(0.71-0.84)	68,00%	83,00%
Nash	(0.59-0.71)	58,00%	68,00%
Ίνωση	(0.61-0.75)	54,00%	85,00%

Πίνακας 6[12] εκτίμηση επιπέδων CK18 ως βιοδείκτη , ίνωση , Nash και Nafld

Βιοδείκτες οξειδωτικού Στρές

Το οξειδωτικό στρες έχει καθιερωθεί ως βασικός παράγοντας στην ανάπτυξη του NASH, αν και οι ακριβείς αλληλεπιδράσεις αυτή η πολύπλοκη διαδικασία με την ανάπτυξη της ασθένειας και εξέλιξης παραμένουν ασαφείς. Αρκετές μελέτες έχουν μετρήσει με επιτυχία δείκτες τόσο αυξημένου οξειδωτικού στρες και μειωμένη αντι-οξειδωτικής ικανότητα σε ασθενείς με NAFLD.

Η ομάδα του Chalasani [15], μεέτρησε τη συστηματική υπεροξείδωση λιπιδίων σε ασθενείς με NASH. Οξειδωμένη LDL και υποστρώματα που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS) και έγινε σύγκριση μεταξύ των ασθενών με NASH και με κοντρόλ με καθορισμένη ηλικία και φύλο, από αυτούς αποκλείστηκαν διαβητικά άτομα. Τόσο η οξειδωμένη LDL και τα TBARS ήταν σημαντικά υψηλότερες στην ομάδα NASH. Επιπλέον, και οι δύο δείκτες ήταν ανεξάρτητοι με την αντίσταση στην ινσουλίνη. Έρευνα των Videla et al [16] έδειξε μια προοδευτική μείωση των επιπέδων της υπεροξειδικής δισμουτάσης (SOD) της υπεροξειδικής καταλάσης της υπεροξειδικής γλουταθειόνης σε όλο το ιστολογικό φάσμα της νόσου. Επίσης μετρήσε την αναγωγική ικανότητα τους τρισθενούς σιδήρου στο πλάσμα, ενός δείκτη αντιοξειδωτικής ικανότητας και βρέθηκε να είναι μειωμένος σε άτομα με NASH. Μια τουρκική ομάδα [17] μετρήσε τα επίπεδα της ερυθροκυττάρων GSH, SOD και της καταλάσης σε αποδεδειγμένους με βιοψία ασθενείς με NAFLD, και βρήκε σημαντικά χαμηλότερα επίπεδα και στα τρία αντιοξειδωτικά ενζύμα.

Βιοδείκτες ίνωσης

Η δευδροεπινανεδοστερόνη είναι μια στεροειδής ορμόνη γνωστή ότι επηρεάζει την ευαισθησία στο οξειδωτικό στρες. Η μέτρηση των κυκλοφορούντων επιπέδων της στο ορό, έχει δείξει ότι υπάρχει μια αρνητική συσχέτιση με τα στάδια ίνωσης της NASH. Το υαλουρονικό οξύ, μέλος του εξωκυτταρικού δικτύου στους περισσότερους ιστούς, έχει δειχθεί από πολλές μελέτες ότι συσχετίζεται με τα προχωρημένα στάδια της ίνωσης στην NASH. Τέλος τόσο η περιεκτικότητα στο πλάσμα της πεντραξίνης 3, όσο και επίπεδα του ορού της ενοθελίνης 1 έχει δειχθεί ότι συσχετίζονται και αυτά με τα στάδια της ίνωσης. Η ουσίες αυτές έχουν γίνει το επίκεντρο έρευνας για υποψήφιοι βιοδείκτες στην νόσο, ενώ το υαλουρονικό ήδη χρησιμοποιείται (eLf test).

Βιοδείκτες που προέρχονται από μη - στοχευμένες προσεγγίσεις

Μελέτες γονιδιακής έκφρασης

Ηπατικές μελέτες γονιδιακής έκφρασης παρέχουν μια εικόνα για πιθανούς μηχανισμούς παθογένεσης, καθώς και για εύρεση βιοδεικτών της νόσου. Η χρήση ιστού ήπατος σε αυτές τις μελέτες έκφρασης γονιδίων αναιρεί την μη επεμβατική φύση των βιοδεικτών

Ωστόσο δεδομένα γονιδιακής έκφρασης μπορεί να προσδιορίσουν τις υποψήφιους δείκτες μετρήσιμους στον ορό, καθιστώντας το ένα δυνητικά ισχυρό εργαλείο στο κυνήγι για μη-επεμβατικούς δείκτες.

Τα πειράματα μπορούν να προσαρμοστούν, εστιάζοντας σε ένα συγκεκριμένο γονίδιο-στόχο. Οι Younossi et al. (18) χρησιμοποίησαν μια προσαρμοσμένη σειρά του cDNA σε μικρο-συστοιχίες, που περιείχαν 5220 γονίδια, για να ερευνήσουν τη διαφορική-ηπατική έκφραση γονιδίων σε ασθενείς με NASH. Βρήκαν ένα σύνολο από 34 διαφορετικά εκφρασμένα γονίδια κατά τη σύγκριση NASH με τον έλεγχο, 19 εκ των οποίων δείχθηκαν να μην είναι εξαιτίας της παχυσαρκίας. Τέσσερις από αυτές αλλαγές στα γονίδια επιβεβαιώθηκαν με αντίστροφης μεταγραφής αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (rtPCR). Οι Sreekumar et al. (19) σύγκρινε την γονιδιακή έκφραση σε ασθενείς με κίρρωση που προέρχεται από NASH και με ασθενείς με κίρρωση. Σε αυτή την μελέτη βρέθηκαν 16 γονίδια που παρουσιάζουν διαφορετική έκφραση στην ομάδα NASH. Πολλά από τα γονίδια που εμπλέκονται στη αντιοξειδωτική απόκριση βρέθηκαν να υποεκφράζονται όπως επίσης και γονίδια που εμπλέκονται στον μεταβολισμό των λιπαρών οξέων και το μεταβολισμό της γλυκόζης.

Οι μελέτες GWAS, παρέχουν μια μέθοδο για εκτίμηση ενός μεγάλου αριθμού πολυμορφισμών ενός νουκλεοτιδίου SNP s. Πολλές GWAS έχουν διεξαχθεί σε πληθυσμούς σχετικά με την μη αλκοολική λιπώδη νόσο. Στην μελέτη των Chalasani et al. (21) οι συγγραφείς έκαναν GWAS ανάλυση σε μια ομάδα ασθενών με NAFLD που χαρακτηρίζονται από ιστολογικά κριτήρια. Αρκετά SNPs συσχετίστηκαν με τις διαφορετικές ιστολογικές παραμέτρους, της νόσου συμπεριλαμβανομένου ενός SNP της τρανσφεράσης του διφωσφορικού φαρνεζυλίου. Σε μια προγενέστερη μελέτη GWAS, Romeo et al. (22) περιγράφεται ένα SNP της PNPLA3 να σχετίζεται έντονα με τόσο με το ηπατική λίπος όσο και με την ηπατική φλεγμονή.

Μελέτες πρωτεομικής

Οι μελέτες πρωτεομικής, εξετάζουν ειδικά πρότυπα πρωτεϊνικής έκφρασης και προφίλ. Υπάρχουν πολλές διαφορετικές προσεγγίσεις πρωτεομικής μελέτης, ορισμένα από αυτά παρέχουν αναγνώριση μοτίβων και υποστρωμάτων. (SELDI TOF) ενώ άλλες παρέχουν μόνο αναγνώριση (τζελ 2 διαστάσεων)

Άλλες περισσότερα εξελιγμένες μέθοδοι παρέχουν δεδομένα ποσοτικοποίησης, τόσο

σχετικής όσο και απόλυτης [ICAT, ισοβαρής ετικέτες για τη σχετική και απόλυτη ποσοτικοποίηση (iTRAQ) και Label FREE]. Είναι επίσης δυνατή η χρήση πολύπλοκων μεθόδων πρωτεομικής για την επικύρωση δεδομένων έκφρασης πρωτεΐνης (πολλαπλή αντίδραση παρακολούθησης), αν και αυτή μπορεί να είναι περίπλοκη, χρονοβόρα και πολυέξοδη.

Αλγόριθμοι διάγνωσης

Οι δοκιμές με αλγόριθμους χρησιμοποιούν συχνά πολύπλοκες μαθηματικές εξισώσεις για να εκτιμηθεί η χρησιμότητα ενός συνδυασμού απλών δεικτών στη διάγνωση και σταδιοποίηση της NAFLD. Ο απώτερος σκοπός των δοκιμών αυτών είναι να παρέχουν ένα ισχυρό μέσο διάγνωσης και σταδιοποίησης της NAFLD μη επεμβατικά. Κάθε τεστ αλγόριθμων ποικίλλει στο στόχο του - μερικοί προορίζονται για να διαφοροποιήσουν την απλή στεάτωση από τη NASH, ενώ άλλοι εστιάζουν περισσότερο στην πρόβλεψη της σοβαρότητας της ίνωσης σε ασθενείς με NASH. Αυτές οι διαφορές στα τεστ προσθέτουν ένα βαθμό δυσκολίας κατά την αξιολόγηση και σύγκριση των επιδόσεων τους.

Οι περισσότερες μελέτες αλγόριθμων χρησιμοποιούν AUROC για να εκτιμηθεί η απόδοση του συστήματος βαθμολόγησης. AUROC τιμές μεγαλύτερες από 0,8 δείχνουν καλή διαγνωστική απόδοση, ενώ τιμές κάτω από 0,8 δείχνουν μη βέλτιστη απόδοση. Όσο πιο κοντά η τιμή στο 1, τόσο μεγαλύτερη η διαγνωστική αξία του τεστ.

Συνδυαστικά μοντέλα διάγνωσης

Σκοπός αυτών των δοκιμασιών είναι η διάγνωση ίνωσης σε ένα πληθυσμό ασθενών με μη αλκοολική λιπώδη νόσο του ήπατος. Μία από τις πρώτες μελέτες του είδους, χρησιμοποιεί ένα συνδυασμό ALT, BMI ηλικίας και τριγλυκεριδίων για να προβλέψει την παρουσία προχωρημένης ίνωσης σε υπέρβαρους ασθενείς. Η δοκιμασία αυτή ονομάστηκε **BAAT** και μπορούσε να προβλέψει την παρουσία ίνωσης με AUROC 0,84.

Ο αλγόριθμος **BARD** αναπτύχθηκε αργότερα και δοκιμάστηκε σε μεγαλύτερο πληθυσμό (897 ασθενείς) και περιλάμβανε το συνδυασμό BMI ηλικίας **AST/ALT** και την παρουσία διαβήτη τύπου 2. Το BARD τεστ μπορεί να προβλέψει την προχωρημένη ίνωση με καμπύλη AUROC 0,81.

BARD score Άθροισμα (μέγιστη τιμή 4) :

$BMI \geq 28 = 1$ πόντος + AR (aminotransferases ratio) of $\geq 0.8 = 2$

πόντοι + DM = 1 πόντος.

Score 0-1 έχουν υψηλή αρνητική προγνωστική αξία για σοβαρή ίνωση.

Το **ELF** τεστ, χρησιμοποιεί την ποσότητα υαλουρονικού στον ορό με άλλους δείκτες όπως η παχυσαρκία, ο διαβήτης τύπου 2, η ηλικία, ALT/AST και προβλέπει

την προχωρημένη ίνωση με καμπύλη 0,92.Η προσθήκη στο τεστ και άλλων παραμέτρων όπως το BMI , αλβουμίνη και αιμοπετάλια αύξησε την διαγνωστική αξία του στο 0,98.Η προγνωστική αξία του θετικού αποτελέσματος PV+ 90% ενώ η προγνωστική αξία του αρνητικού PV- είναι 82% .

Fibrotest αναπτύχθηκε και αξιολογήθηκε για χρήση σε ασθενείς με NAFLD πρόθεση την διάγνωση προχωρημένης ίνωσης .Χρήση του σε μία κλινική με ασθενείς , κατάφερε καμπύλη AUROC 0,92 , ενώ όταν χρησιμοποιήθηκε σε διάφορες κλινικές και αξιολογήθηκε η AUROC έφτασε το 0,82 μόνο .

Το σκορ FibroTest υπολογίζεται από τα αποτελέσματα ενός τεστ αίματος έξι παραμέτρων, συνδυάζοντας έξι δείκτες του ορού με την ηλικία και το φύλο του ασθενούς:αλβουμίνη,ασπартαμινωτική αμινοξέως (AST),Haptoglobin,απολιποπρωτεΐνη,A1,Gamma-γλουταμυλτρανσπεπτιδάσης(GGT),ολική χολερυθρίνη, και τρανσαμινάση της αλανίνης(ALT).

ALT χρησιμοποιείται σε μία δεύτερη εκτίμηση ονομάζεται ActiTest που αποτελεί μέρος του FibroTest.

SteatoTest αναπτύχθηκε με σκοπό να ξεχωρίσει την απλή στεάτωση από την στεατοηπατίτιδα (NASH) .

NashTest όπως προβλέπει και το όνομα του είναι ένα αλγοριθμικό τέστ της NASH .Χρησιμοποιεί έναν συνδυασμό 13 παραμέτρων , βιοχημικών και κλινικών με AUC 0,79 τόσο στις πειραματικές δοκιμασίες , όσο και στις αξιολόγησεις.

APRI Test Ast Platelet Radio Index τιμές < 0,3 και < 0,5 αποκλείουν την ίνωση και την κίρρωση αντίστοιχα
τιμή >1,5 σημαντική ίνωση

$$APRI = \frac{\frac{AST \text{ level}}{ULN *}}{\text{Platelet counts } (10^9 / L)} \times 100$$

*ULN, AST upper level of normal (or 56 IU/L)

Το 2012 έγινε εκτενής μελέτη [14] με σκοπό να ερευνήσει τις επιδόσεις τεσσάρων αλγόριθμων διάγνωσης , του Fibrotest για την διάγνωση της προχωρημένης ίνωσης,

Actitest για την στεάτωση , Steatotest και Nashtest για την στεατοηπατίτιδα .
 Στη μελέτη συμπεριλήφθηκαν 494 ασθενείς με σοβαρή παχυσαρκία BMI > 35g/m²
 και αξιολογήθηκαν η ευαισθησία η ειδικότητα , η θετική και αρνητική προγνωστική
 αξία και η AUROC .

Συστήματα βαθμολόγησης

Στο Fibrotest στο Actitest και στο Steatotest οι βαθμολογίες κυμαίνονται από μηδέν
 έως 1,00, με υψηλότερες βαθμολογίες να δείχνουν μεγαλύτερη πιθανότητα
 σημαντικών βλαβών.

<i>Fibrotest score</i>	<i>0.00–0.27</i>	<i>>0.27–0.48</i>	<i>>0.48–0.58</i>	<i>>0.58–0.74</i>	<i>>0.74</i>
<i>Στάδιο ίνωσης</i>	<i>F0</i>	<i>F1</i>	<i>F2</i>	<i>F3</i>	<i>F4</i>

<i>Actitest score</i>	<i>0.00–0.17</i>	<i>>0.17–0.52</i>	<i>>0.52–0.62</i>	<i>>0.62</i>
<i>Στάδιο στεάτωσης</i>	<i>A0</i>	<i>A1</i>	<i>A2</i>	<i>A3</i>

<i>Steatotest score</i>	<i>0.00–0.57</i>	<i>>0.57–0.69</i>	<i>>0.69–1.000</i>
<i>Στάδιο στεατοηπατίτιδας</i>	<i>S0</i>	<i>S1</i>	<i>S2-S3</i>

<i>Nashtest</i>	<i>0,25</i>	<i>0,5</i>	<i>0,75</i>
	<i>No Nash</i>	<i>Possible Nash</i>	<i>Nash</i>

Πίνακες 7 : συστήματα βαθμολόγησης για τα τέσσερα tests.

Biomarker (cutoff)	Disease (Prevalence)	Se	NPV	Sp	PPV
FibroTest (0.27)	>F0 (51.4%)	34/118 13.4% ¹	234/454 51.5%	234/240 97.5%	34/40 85.0%
FibroTest (0.48)	>F1 (9.9%)	4/49 8.2%	443/488 90.8%	443/445 99.6%	4/6 66.7%
SteatoTest (0.38)	>S0 (86.0%)	381/425 89.7%	31/75 41.3%	31/69 44.9%	381/419 90.9%
SteatoTest (0.69)	>S1 33% (54.3%)	103/268 38.4%	184/349 52.7%	184/226 81.4%	103/145 71.0%
NashTest (0.70)	NAS>4 (17.2%)	12/85 14.1%	392/465 84.3%	392/409 95.8%	12/29 41.4%
NashTest (0.50)	NAS>2 (42.9%)	197/212 92.9%	95/110 86.4%	95/282 33.7%	197/384 51.3%
ActiTest (0.29)	NAS>4 (17.2%)	24/85 28.2%	371/432 85.9%	371/409 90.7%	24/62 38.7%
ActiTest (0.17)	NAS>2 (42.9%)	92/212 43.4%	241/361 66.8%	241/282 85.5%	92/133 69.2%

Εικόνα 6: πίνακας 8:Ο παραπάνω πίνακας δείχνει τα αποτελέσματα και των τεσσάρων τεστ.Fibrotest,Steatotest,Nashtest,Actitest.Την ευαισθησία (Se) , την ειδικότητα (Sp) την επικράτηση(prevalance) της νόσου , την προγνωστική αξία του θετικού(PPV) και του αρνητικού(NPV) αποτελέσματος όπως επίσης και το σημείο αποκοπής(cutoff) .

Ενότητα 2

Σύγκριση επιπέδων βιοδεικτών μη αλκοολικής λιπώδη νόσου σε πληθυσμό με διαγνωσμένο λιπώδες και φυσιολογικό ήπαρ

Σκοπός

Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η διερεύνηση των επιπέδων γνωστών βιοδεικτών της μη αλκοολικής λιπώδης νόσου σε πληθυσμό με λιπώδη διήθηση στο ήπαρ και σύγκρισή τους με τα επίπεδα, σε πληθυσμό με υγιές ήπαρ .

Θα γίνει προσπάθεια να αναγνωριστούν τυχόν συσχετίσεις των επιπέδων τους στην απλή στεάτωση που θα μπορούσαν να έχουν κάποια διαγνωστική αξία .

*εκτός από εκτίμηση ανεξάρτητων βιοχημικών αποτελεσμάτων ,επειδή στην απλή στεάτωση τα επίπεδα τους συνήθως κυμαίνονται εντός των φυσιολογικών ορίων , βασικός σκοπός μας να μελετηθεί ως διαγνωστικό εργαλείο η χρήση ενός συνδυασμού χαρακτηριστικών και βιοδεικτών (BMI , IL6 , TG s) .

Μεθοδολογία

Το παρόν δείγμα αποτελείται απο 176 άτομα , όλοι εθελοντές και είναι μέρος μιας μεγαλύτερης έρευνας που μετέχουν συνολικά 450 άτομα .Η συμμετοχή των εθελοντών έγινε με ενυπόγραφη συναίνεση τους ενώ η έγκριση για την πραγματοποίηση της μελέτης λήφθηκε από την επιτροπή έρευνας του Επιστημονικού Συμβουλίου του Γενικού Νοσοκομείου Αθηνών (Λαϊκό Νοσοκομείο) και από την Επιτροπή Βιοηθικής του Χαροκοπείου Πανεπιστημίου. Η αξιολόγηση των ατόμων και η λήψη δειγμάτων πραγματοποιήθηκε στα εργαστήρια του Διαβητολογικού τμήματος της Α' Προπαιδευτικής Παθολογικής Κλινικής (ΑΠΠΚ) του Γενικού Νοσοκομείου Αθηνών (Λαϊκό Νοσοκομείο) όπως και η απομόνωση πλάσματος και όρου .Οι βιοχημικές και αιματολογικές εξετάσεις έγιναν στα εργαστήρια του Γενικού

Λαϊκού Νοσοκομείου Αθηνών , ενώ περαιτέρω αναλύσεις (ανοσοενζυμικές) έγιναν στο εργαστήριο Μοριακής και κυτταρική βιολογίας του ανθρώπου του Χαροκόπειου Πανεπιστημίου Αθηνών .

Τα υπερηχογραφήματα ήπατος με σκοπό την διάγνωση της λιπώδους διήθησης έγιναν στο ακτινολογικό τμήμα του ΓΝΑ .

Κριτήρια

Στην μελέτη πήραν μέρος άτομα ηλικίας 18 έως 65 ετών και των δύο φύλων .

Βασικό κριτήριο αποκλεισμού ήταν : η συστηματική λήψη αλκοόλ (έως 20g/ημέρα για τις γυναίκες και έως 30g/ημέρα για τους άντρες)

Αποκλείστηκαν επίσης όσοι νοσούν από πολυκυστικές ωοθήκες , ηπατίτιδα Α,Β, C,D και Ε ,όσοι έχουν ασθένεια Wilson , αιμοχρωμάτωση ή οποιαδήποτε αυτοάνοση νόσο του ήπατος (προς αποφυγή λήψης αποτελεσμάτων που προέρχονται από οποιαδήποτε άλλη ηπατική νόσο)Ακόμα, στόχος μας ήταν να μην χρησιμοποιήσουμε διαβητικούς , παρόλα αυτά στην έρευνα συμμετείχαν 6 .

Διάγνωση λιπώδους διήθησης και κατηγοριοποίηση

Η διάγνωση της ύπαρξης ή όχι λιπώδους διήθησης (στεάτωσης) έγινε με χρήση υπερηχογραφήματος ήπατος .Τα κριτήρια για την διάγνωση είναι η

- διάχυτη υπερηχογένεια του ήπατος
- αυξημένη ηχογένεια σε σύγκριση με ηχογένεια νεφρών
- ασαφοποίηση αγγειακών τοιχωμάτων

Με βάση τα παραπάνω κριτήρια , δημιουργήθηκε μία κατάταξη της περιεκτικότητας του ήπατος σε λίπος απο 0 έως 3 .

Ως 0 θεωρούμε ένα φυσιολογικό ήπαρ χωρίς λίπος , ενώ 2 και 3 , ένα ήπαρ με πολύ έως πάρα πολύ λίπος .Αύξησης της ηχογένειας του ήπατος δίνει την χαρακτηριστική εικόνα "bright liver" .

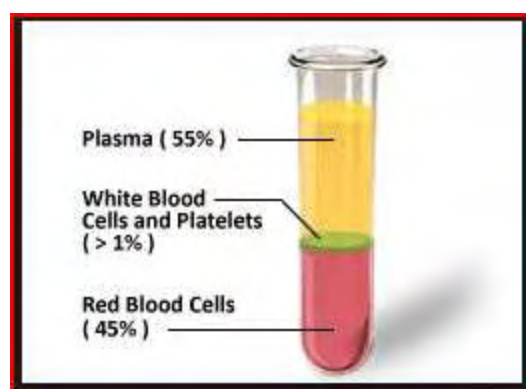
Πίνακας 9: (κάτω)Κατάταξη λιπώδους διήθησης,βάση των εκάστοτε χαρακτηριστικών του υπερηχογραφήματος.

Ηχογένεια	Κατάταξη
Φυσιολογική ηχογένεια	0 όχι λίπος
Ελαφριά αυξημένη ηχογένεια-φυσιολογική απεικόνιση διαφράγματος και αγγείων	1 λίγο λίπος
Μέτρια αύξηση-ελαφρά διαταραχή απεικόνισης	2 λίπος
Μεγάλη αύξηση ηχογένεια- περιορισμένη απεικόνιση διαφράγματος και αγγείων	3 πολύ λίπος



Εικόνα 7 : υπερηχογράφημα άνω κοιλίας που απεικονίζει ένα ήπαρ με στεάτωση (λιπώδη διήθηση)Διακρίνεται περιορισμένη απεικόνιση διαφράγματος και αγγείων , μεγάλη αύξηση στην ηχογένεια (bright liver).

Επίσης έγινε καταγραφή των ανθρωπομετρικών χαρακτηριστικών , όπως το BMI η περιφέρεια μέσης και γλουτών .



Βιοχημικές αναλύσεις

Πραγματοποιήθηκε αιμοληψία , ύστερα από 12ωρη νηστεία .Έγινε απομόνωση ορού και πλάσματος και λευκών αιμοσφαιρίων έπειτα από φυγοκέντριση στις 4000rpm/10

minutes / 4 C .Έγινε αποθήκευση δειγμάτων σε βαθιά κατάψυξη (-80 C) για περαιτέρω εξετάσεις .Έγιναν οι εξής βιοχημικές δοκιμασίες

Μέτρηση γλυκόζης , ολικής χοληστερόλης , LDL , HDL , τριγλυκερίδια , σίδηρος και φερριτίνη , CRP .

Η μέτρηση των συγκεντρώσεων της γλυκόζης πλάσματος έγινε με την ενζυμική μέθοδο της εξοκινάσης της γλυκόζης σε αναλυτή Architect 8000c. Η μέτρηση των λιπιδίων και των λοιπών βιοχημικών παραμέτρων έγινε με τον αυτόματο αναλυτή Autoanalyzer (Architect 8000c, Abbott).Ο προσδιορισμός της hsCRP έγινε με τη μέθοδο της χημειοφωταύγειας.

Τρανσαμινάσες :ALT , AST και ο λόγος AST/ALT

Και τα δύο ένζυμα προσδιορίζονται με ενζυμική κινητική μέθοδο στους 37ο C.Το δείγμα μπορεί να είναι ορός ή πλάσμα (EDTA, ηπαρίνη) χωρίς αιμόλυση. Ο αποχωρισμός ορού ή πλάσματος από τα έμμορφα στοιχεία θα πρέπει να γίνει εντός δύο ωρών. Το δείγμα διατηρείται στους 2-8ο C για 7 ημέρες ή για 2 μήνες στους -20.

Για να γίνει διάκριση της ηπατικής βλάβης από αλκοολισμό ή όχι

χρησιμοποιείται ο λόγος AST/ALT. Αν έχει τιμή < 2,0 τότε πρόκειται για **αλκοολική ηπατική βλάβη**.

Αντίθετα αν AST/ALT > 2,0 τότε η βλάβη του ήπατος δεν οφείλεται σε αλκοόλ .

Γ-γλουταρυλ-τρανσπεπτιδάση

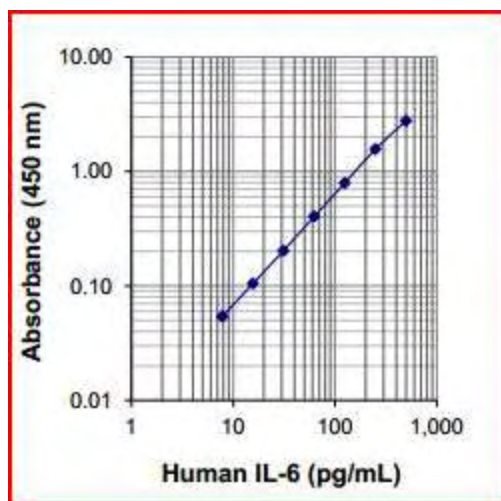
Η γ-GT προσδιορίζεται με χημική μέθοδο και συγκεκριμένα με ενζυμική κινητική μέθοδο στους 37οC με υπόστρωμα GLUPA-Clathrate (Szasz). Το δείγμα μπορεί να είναι ορός ή πλάσμα (EDTA, ηπαρίνη, κιτρικό νάτριο) χωρίς αιμόλυση. Ο αποχωρισμός ορού ή πλάσματος από τα έμμορφα στοιχεία θα πρέπει να γίνει εντός δύο ωρών. Το δείγμα διατηρείται στους 2-8ο C για 7 ημέρες ή για 6 μήνες στους -20ο C.



Ιντερλευκίνη 6 (IL 6)

Η ιντερλευκίνη 6 μετρήθηκε με χρήση High Sensitivity Sandwich Elisa. Χρησιμοποιήθηκε το kit Legend Max Human IL 6 elisa with precoted plates της BioLegend που κάνει ακριβή ποσοτικοποίηση της ανθρώπινης ιντερλευκίνης 6 , από ορό , πλάσμα κυτταρικές καλλιέργειες και άλλα βιολογικά υγρά . Το μηχάνημα που χρησιμοποιήθηκε για τον καθορισμό της οπτικής πυκνότητας των δειγμάτων είναι το BioTek's PowerWave HT microplate spectrophotometer το οποίο χρησιμοποιεί Gen5™ 2.0 Data Analysis Software. Τα σημαντικότερα πλεονεκτήματα του συγκεκριμένου μηχανήματος είναι ότι παράγει γρήγορα αποτελέσματα και μπορεί να εμφανίσει πραγματικά ποσοτικά αποτελέσματα. Ο υπολογισμός των αποτελεσμάτων και η πρότυπη καμπύλη έγιναν με υπολογιστικό πρόγραμμα 4p logistics. Περαιτέρω στατιστικές αναλύσεις έγιναν με το Medcalc .

Εικόνα : η πρότυπη καμπύλη(από τα πρότυπα δείγματα με γνωστή περιεκτικότητα) μας βοηθά να προσδιορίσουμε τις συγκεντρώσεις των δειγμάτων μας .



Στατιστικές αναλύσεις

Οι ποσοτικές μεταβλητές συνοψίστηκαν χρησιμοποιώντας μέσους όρους και τυπικές αποκλίσεις (standard deviation).

Η σύγκριση των μέσων όρων των τιμών μεταξύ υγιών και ασθενών έγινε με δοκιμασία κατά Student's t-test. Ο έλεγχος της συσχέτισης έγινε με δοκιμασία Pearson Σε όλες τις στατιστικές αναλύσεις το επίπεδο σημαντικότητας ορίστηκε ως μικρότερο 0.05 και διπλής κατεύθυνσης .

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΕΝΖΥΜΙΚΗΣ ΑΝΟΣΟΠΡΟΣΡΟΦΗΤΙΚΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ (ELISA)

Η **ELISA** αποτελεί μια ετερογενή *ανοσοδοκιμασία* ή *ανοσοχημικό προσδιορισμό*. Οι ανοσοχημικοί προσδιορισμοί περιλαμβάνουν τις ανοσοενζυμικές μεθόδους (Enzyme immunoassays, EIA) και τις ραδιοανοσολογικές μεθόδους (Radioimmunoassays, RIA) οι οποίες χρησιμοποιούν ένα αντίσωμα υψηλής εξειδίκευσης για την ανίχνευση του υπό μελέτη αντιγόνου ή αντισώματος, δηλαδή βασίζονται στην εξαιρετικής εξειδίκευσης ανοσοχημική αντίδραση αντιγόνου-αντισώματος. Οι ανοσοαναλύσεις διακρίνονται σε ομογενείς και ετερογενείς. Η ELISA είναι μία ετερογενής ανοσοδοκιμασία, καθώς είναι απαραίτητος ο διαχωρισμός των ελεύθερων αντιδρώντων μορίων από τα σχηματιζόμενα ανοσοσύμπλοκα. Η αρχή της ανοσοενζυμικής δοκιμασίας ELISA στηρίζεται στη φυσική ιδιότητα των αντιγόνων και των αντισωμάτων να ενώνονται μεταξύ τους με εξαιρετικά μεγάλη συνάφεια και ειδικότητα και στην ανίχνευση του συμπλέγματος αντιγόνου-αντισώματος (AgAb) με τη χρησιμοποίηση συγκεκριμένου συμπλέγματος, το οποίο αποτελείται από ομόλογο αντίσωμα και ένα ένζυμο.

Η ποσότητα του συμπλόκου αντιγόνου-αντισώματος προσδιορίζεται από την προσθήκη κατάλληλου υποστρώματος, το προϊόν της αντίδρασης του οποίου, με βοήθεια ενζύμου, δίνει έγχρωμο προϊόν. Η μέτρηση της έντασης του χρώματος σε ειδικά φωτόμετρα δίνει πληροφορίες για τον αριθμό των σημασμένων συμπλόκων και κατ'έκταση για την ποσότητα του αντιγόνου ή αντισώματος που θέλουμε να ανιχνεύσουμε στο αρχικό δείγμα. Η ποσοτικοποίηση γίνεται με την βοήθεια πρότυπης καμπύλης. Η ELISA αποτελεί μία τεχνική υψηλής ευαισθησίας, που συνδυάζει απλή οργανολογία, χαμηλό κόστος και χαμηλή επικινδυνότητα ιχνηθετών.

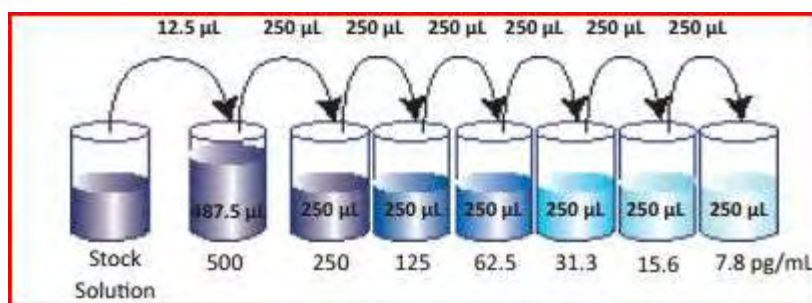
Τα ένζυμα που συνήθως χρησιμοποιούνται είναι η αλκαλική φωσφατάση και η υπεροξειδάση. Ανάλογα με το τι θέλουμε να ανιχνεύσουμε χρησιμοποιούμε σημασμένο αντιγόνο ή αντίσωμα. Το ένα από τα δύο συστατικά ακινητοποιείται σε στερεά επιφάνεια με την διαδικασία της φυσικής προσρόφησης σε επιφάνειες από πλαστικό που συνήθως είναι πολυστυρένιο.

Πρωτόκολλο

Για την δοκιμασία μας χρησιμοποιήθηκε ορός από 176 εθελοντές (2 Plates των 96 βοθρίων έκαστο ,στα οποία περιλήφθηκαν και 14 πρότυπα) .Ο ορός λήφθηκε ύστερα από φυγοκέντριση του δείγματος αίματος στις 4000rpm/10 λεπτά / 4 C⁰ και αποθηκεύτηκε έως την χρήση του σε βαθιά κατάψυξη (- 80 C) .

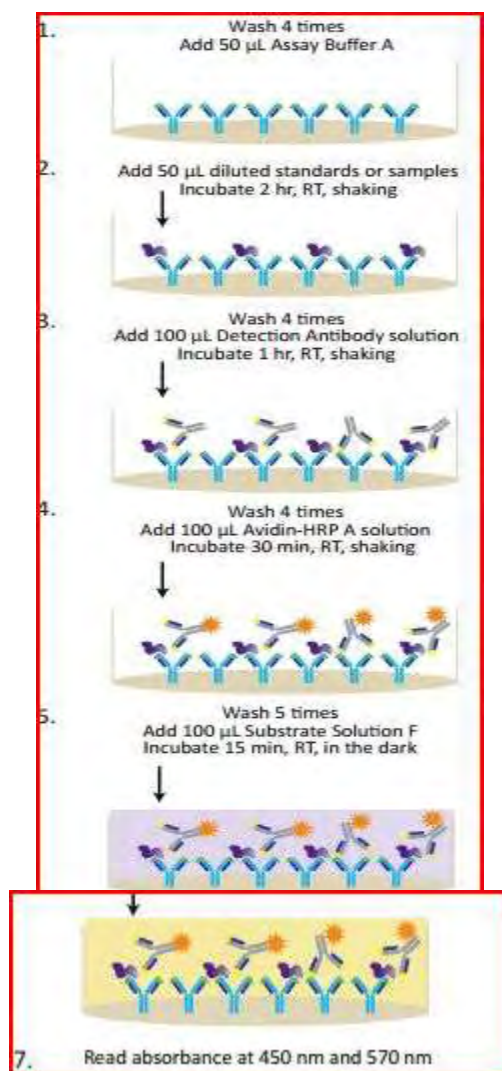
Προετοιμασία αντιδραστηρίων και δειγμάτων

- αραίωση του 20X Wash Buffer σε 1X με απιονισμένο ύδωρ.
- Ανασυνθέτουμε το λυοφιλιωμένο Human IL 6 πρότυπο , προσθέτοντας την κατάλληλη ποσότητα απο το Assay Buffer A , για να δημιουργήσουμε ένα στοκ στανταρ περιεκτικότητας 20ng/mL.
- Προετοιμάζουμε 500μL απο το 500pg/mL τοπ στάνταρ , αραιώνοντας 12,5μL απο το διάλυμα στάνταρ στοκ σε 487,5 μL απο το Assay Buffer.
- Κάνουμε 6 διαδοχικές στα δύο αραιώσεις απο το 500pg/mL τοπ στάνταρ σε ξεχωριστούς σωλήνες χρησιμοποιώντας το Assay Buffer .
- Έτσι οι συγκεντρώσεις στους σωλήνες θα είναι οι εξής : 500pg/mL, 250pg/mL , 125pg/mL , 62,5pg/mL , 31,3 pg/mL , 15,6pg/mL , 7,8pg/mL .
- Το Assay buffer το χρησιμοποιούμε ως 0pg/mL.



Διαδικασία

- Πλένουμε τα πλάτες 4 φορές με τουλάχιστον 300μL απο 1X Wash Buffer.απομακρύνουμε όλο το υγρο με αναστροφή της πλάκας. Στο τελευταίο ξέπλυμα ακολουθεί χτύπημα της πλάκας στον πάγκο εργασίας πάνω σε απορροφητικό χαρτί ώστε να απομακρυνθεί όλο το Wash Buffer καθώς και οι φυσαλίδες.
- Προσθέτουμε 50μL απο το ρυθμιστικό διάλυμα (assay buffer) σε κάθε πηγαδάκι
- προσθέτουμε 50μL είτε από το δείγμα είτε από το πρότυπο διάλυμα σε κάθε πηγαδάκι
- καλύπτουμε τα plates και επωάζουμε σε θερμοκρασία δωματίου για 2 ώρες ενώ γίνεται ανακινούνται σς 200gr
- απορρίπτουμε το περιεχόμενο στο νιπτήρα και πλένουμε 4 φορές όπως στο βήμα 1 .
- προσθέτουμε 100μL απο IL6 αντίσωμα ανίχνευσης σε κάθε βοθρίο , καλύπτουμε το πλακίδιο και επωάζουμε σε θερμοκρασία δωματίου για 1 ώρα ενώ γίνεται ανακίνηση
- απορρίπτουμε το περιεχόμενο στο νιπτήρα και πλένουμε όπως στο βήμα 1
- προσθέτουμε 100μL διάλυμα Avidin HRP A σε κάθε βοθρίο , καλύπτουμε τα πλακίδια , επωάζουμε για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου (ανακίνηση)
- απορρίπτουμε το περιεχόμενο στο νιπτήρα , πλένουμε τα πλακίδια 5 φορές , όπως στο βήμα 1
- προσθέτουμε 100μL διάλυμα υποστρώματος σε κάθε βοθρίο ,επωάζουμε για 15 λεπτά στο σκοτάδι .τα βοθρία που περιέχουν ιντερλευκίνη 6 θα γίνουν μπλέ και η ένταση του χρώματος θα αντανακλά την περιεκτικότητα .
- Σταματάμε την αντίδραση , προσθέτοντας 100μL stop solution σε κάθε ένα βοθρίο .το χρώμα θα μετατραπεί από μπλέ σε κίτρινο.
- Διαβάζουμε την απορρόφηση στα 450 nm πρώτα 30 λεπτά μετά την δοκιμασία.



ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Ο καθορισμός της οπτικής πυκνότητας του κάθε βοθρίου πρέπει να πραγματοποιείται εντός μισής ώρας. Τοποθετούμε την πλάκα σε ειδικό σαρωτή και ρυθμίζουμε το μηχάνημα έτσι ώστε η μέτρηση να γίνεται στα 450nm. Υπολογίζουμε το μέσο όρο από τις δύο τιμές της οπτικής απορρόφησης για κάθε standard και για κάθε δείγμα. Για τον υπολογισμό της τελικής τιμής οπτικής απορρόφησης χρησιμοποιούμε τον παρακάτω τύπο:

$$\text{O.D. Standard ή δείγματος} = \text{Μέσος όρος OD} - \text{OD του zero standard.}$$

Για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης του μορίου στο δείγμα κατασκευάζουμε ένα διάγραμμα της οπτικής πυκνότητας των standards (άξονας y) με τη συγκέντρωση τους (άξονας x) και σχεδιάζουμε την πρότυπη καμπύλη με βάση τα σημεία απορρόφησης των standards. Για να καθορίσουμε τη συγκέντρωση του πεπτιδίου στο δείγμα, πρώτα βρίσκουμε την τιμή απορρόφησης στον κάθετο άξονα και επεκτείνουμε μια οριζόντια γραμμή μέχρι την καμπύλη αναφοράς. Από το σημείο που ενώνονται οι γραμμές επεκτείνουμε μια κάθετη γραμμή μέχρι τον άξονα X και η τιμή που λαμβάνουμε αντιστοιχεί στη συγκέντρωση του πεπτιδίου στο δείγμα.

Αποτελέσματα

Η μη αλκοολική λιπώδης νόσος, όπως έχουμε προαναφέρει έχει πολλές εκφάνσεις από ιστολογικής πλευράς. Κυμαίνεται από την απλής στεάτωση (Simple Steatosis, SS) δηλαδή την εναπόθεση λίπους στο ήπαρ, έως την μη αλκοολική στεατοηπατίτιδα (NASH), την ύπαρξη λίπους με ταυτόχρονη φλεγμονή και την ίνωση (fibrosis). Το πρώτο σημαντικό "χτύπημα" και αφετηρία για την περαιτέρω εξέλιξη της νόσου είναι η δημιουργία λίπους, πράγμα που είναι ασυμπτωματικό και συνήθως περνάει απαρατήρητο. Η έγκαιρη διάγνωση της ύπαρξης του όμως στο κατά τα άλλα ακίνδυνο για πολλούς στάδιο, ίσως είναι η καλύτερη λύση για να χτυπηθεί η νόσος. Η καλύτερη θεραπεία πριν εξελιχθεί σε σοβαρή νόσο είναι να χτυπηθεί η ρίζα του προβλήματος, το λίπος.

Στο στάδιο αυτό εστιάζουμε με την μελέτη μας αυτή, στην εκτίμηση των ιδιαίτερων βιοχημικών και ανθρωπομετρικών χαρακτηριστικών που φέρουν άτομα με στεάτωση στο ήπαρ. Μετρώντας κλασσικούς βιοδείκτες της Nafld, με σκοπό να βρούμε κοινά μοτίβα, πλαίσια επικινδυνότητας και τις βασικές σε επίπεδο βιοδεικτών διαφορές που έχουν σε σχέση με άτομα με υγιές ήπαρ.

*Αναφερόμαστε στην ύπαρξη ή όχι στεάτωσης στο ήπαρ. Διότι με την απεικονιστική μέθοδο που χρησιμοποιήσαμε στην μελέτη (υπερηχογράφημα άνω κοιλίας,) δεν είναι δυνατή η διάγνωση στεατοηπατίτιδας ή ίνωσης.

Το δείγμα που μελετήσαμε έχει ίση κατανομή. Από τα 176 άτομα , στα 88 έχουμε μη αλκοολική λιπώδη διήθηση(στεάτωση) ενώ τα υπόλοιπα 88 όχι .(αναφέρετε ως cases = λιπώδη διήθηση control = φυσιολογικό ήπαρ)

Cases : 51 γυναίκες – 37 άντρες

Control: 49 γυναίκες – 39 άντρες

Από ηλικιακής πλευράς , βλέπουμε μία *σαφέστατη αύξηση* του *μέσου όρου ηλικίας* σε άτομα με λιπώδη διήθηση .*Επιπλέον ανακαλύψαμε αύξηση της ηλικίας είναι ευθέως ανάλογη της αύξησης του βαθμού στεάτωσης .(p=0,044)*

	AGE
CASES	50 ± 11
CONTROL	39,01 ± 12,33

Το πρώτο χαρακτηριστικό , που άμεσα συσχετίζετε με την μη αλκοολική λιπώδη διήθηση είναι ο δείκτης μάζας σώματος .

	BMI
CASES	31,89± 4,9
CONTROL	23,89± 2,8
Significance Level	P<0,0001

Άτομα με δείκτη μάζας σώματος πάνω από $\geq 30 \text{Kg/m}^2$, έχουν πολύ μεγαλύτερη πιθανότητα να έχουν στεάτωση στο ήπαρ .(p= 0,001)

Από ανθρωπομετρικής άποψης το σημαντικότερο χαρακτηριστικό που φέρουν τα περιστατικά με λιπώδη διήθηση σε σχέση με τους υπόλοιπους είναι η αυξημένη περιφέρεια μέσης σε σχέση και ο λόγος περιφέρειας μέση προς περιφέρεια γλουτών .

	WC	HC	W/C
CASES	104.36 ±12,27	114,81 ± 10,16	0,90 ± 0,08
CONTROL	82,64 ± 9,5	102,71 ± 6,31	0,80 ± 0,07
Significance Level	P< 0,0001		

Κύριο χαρακτηριστικά των περισσότερων βιοχημικών αποτελεσμάτων είναι ότι τα άτομα με στεάτωση σε αρκετές περιπτώσεις έχουν *εντός των φυσιολογικών τιμών δείκτες , αλλά τα επίπεδά τους είναι πάντα πιο αυξημένα απο των κοντρόλ .*

Την μεγαλύτερη διαφορά , την λάβαμε στο επίπεδο *τριγλυκεριδίων* P<0,0001, κάτι που ήταν αναμενόμενο μιας και το λίπος στο ήπαρ αποθηκεύεται με αυτή την μορφή .Βρήκαμε επίσης διαφορές ανάμεσα σε control και cases σε HDL , LDL και ολική χοληστερόλη, με πολύ μικρότερη σημαντικότητα .

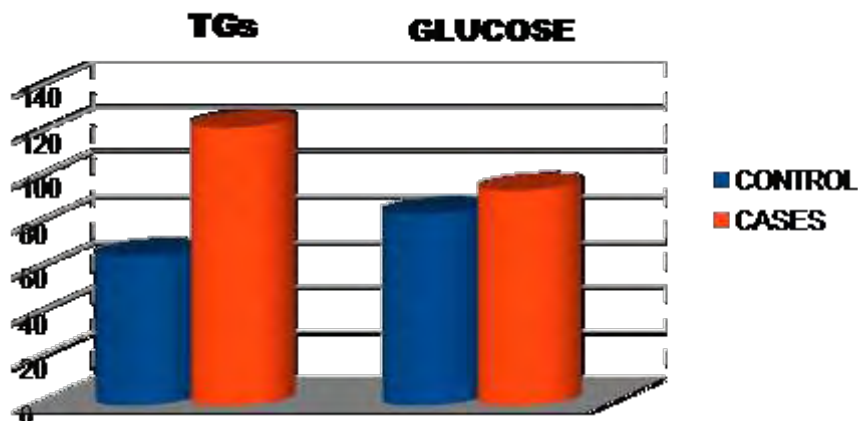
	TG s	HDLc	LDLc	Total Cholesterol
CASES mean	122,86± 63,16	59,23± 18,12	128,38± 43,05	207,3± 54,15
CONTROLmean	66,04± 36,12	53,54± 27,56	110,28± 53,27	182,4± 75,38
Significance level	P<0,0001	P=0,1074	P=0,0141	P=0,0128

Τα επίπεδα γλυκόζης μεταξύ ασθενών και υγιών βρέθηκαν υψηλότερα. P=0,0214.Επίσης οι ασθενείς είναι κατά 66% υπερλιπιδαιμικοί .

Γλυκόζη

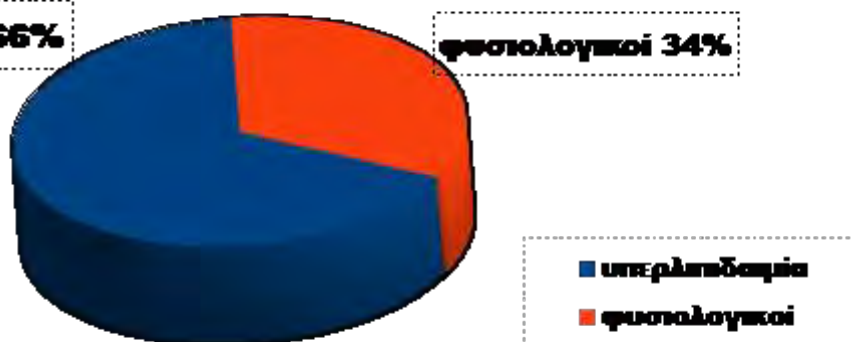
Nafld $95,02 \pm 23,29$

No nafld $84,68 \pm 34,69$



Υπερλιπιδαιμία 66%

φυσιολογικοί 34%



Τρανσαμινάσες γGT - λόγος AST/ALT

Τα επίπεδα *τρανσαμινασών* , είναι η βασική *δοκιμασία που δείχνει δυσλειτουργία στο ήπαρ* .

Οι μέσοι όροι των επιπέδων τους είναι εντός των φυσιολογικών αν και είναι ανεβασμένοι σε σχέση με τους μέσους όρους των κοντρόλ .Το ίδιο ισχύει και για την γ GT . Συγκεκριμένα η διαφορά στα επίπεδα *ανάμεσα στους ασθενείς και στους υγιείς στα επίπεδα SGOT βρέθηκε μικρή $P=0,0725$, ενώ σε SGPT η διαφορά ήταν μεγάλη $P=0,0001$. Η διαφορά το γ GT βρέθηκε και αυτή σημαντική $P=0,0026$.*

Αντίθετα ο λόγος AST/ALT βρέθηκε να είναι μεγαλύτερος στα άτομα με φυσιολογικό ήπαρ P=0,0004.

Αν και βρέθηκαν σημαντικές διαφορές στα επίπεδα μεταξύ των ασθενών και των υγιών , δεν θα μπορούσαν να αποτελέσουν κάποιο δείκτη από μόνα τους της ασθένειας .

	SGOT(U/L)	SGPT(U/L)	γGT(U/L)	AST/ALT
CASES mean	23,76± 10,04	31,78± 21,19	27,76± 22,02	0,85± 0,40
CONTROLmean	21,12± 9,33	21,68± 11,72	18,62± 17,31	1,10± 0,51
Significance Level	P=0,0725	P=0,0001	P=0,0026	P=0,0004

CRP , ΣΙΔΗΡΟΣ ΚΑΙ ΦΕΡΡΙΤΙΝΗ

Η C αντιδρώσα πρωτεΐνη , είναι από τους σημαντικότερους δείκτες φλεγμονής.

Όπως έχουμε προαναφέρει , η παχυσαρκία έχει πλέον χαρακτηριστεί , μέτριου μεγέθους χρόνια φλεγμονώδη κατάσταση .Αν και η φλεγμονή είναι χαρακτηριστικό της στατοηπατίτιδας , η ύπαρξη από μόνη της της **στεάτωσης** θα μπορούσε να έχει κάποιο αντίκτυπο στα επίπεδα μεταξύ υγιών και ασθενών .Τα αποτελέσματα που πήραμε μας δείχνουν μιά σαφέστατη διαφορά στο μέσο όρο των υγιών με των ασθενών , που όμως απο μόνη της δεν θα μπορούσε να έχει κάποια διαγνωστική αξία .Τα επίπεδα της CRP θα μπορούσαν ίσως να έχουν αξία στην διάγνωση της στεάτωσης σε συνδυασμό με άλλους βιοδείκτες.

Στην ανάλυση που κάναμε στα επίπεδα σιδήρου , για τυχόν υπερφόρτωση σιδήρου που παρατηρείται στην νόσο , δεν είχαμε αποτέλεσμα.Όσον αφορά την διαφορά στα επίπεδα σε ασθενείς και υγιείς , αν και υπήρξαν διαφορες δεν είναι φρόνιμο να βγάλουμε συμπεράσματα γιατί Ως γνωστόν τα φυσιολογικά επίπεδα του έχουν μεγάλες διαφορές από άνθρωπο σε άνθρωπο .

	CRP(μg/ml)	Fe (ug/dl)	Fer(ng/ml)
Nafld	6,25± 4,3	105,02± 46,35	115,52± 108,79
No Nafld	4,9± 3,6	97,61± 52,01	76,62± 60,98
Significance Level	P=0,0252	P=0,3158	P=0,0039

Εκτίμηση των επιπέδων Ιντερλευκίνης 6 ως βιοδείκτη της μη αλκοολικής ηπατικής στεάτωσης

Την τελευταία δεκαετία η ιντερλευκίνη 6 έχει γίνει στόχος πολλών ερευνών ως βιοδείκτης της NAFLD , τόσο για την πολυδιάστατη δράσης της στην μεσολάβηση φλεγμονωδών /ανοσολογικών καταστάσεων, όσο και για την δράση της στην επαγωγή απόπτωσης σε συνδυασμό με την κατανόηση της παθοφυσιολογίας της νόσου .

Πολλές μελέτες με χρήση της IL 6 για την διάγνωση της στεατοηπατίτιδας ανεξάρτητα ή σε συνδυασμό με άλλους δείκτες των παθολογικών εκφάνσεων της νόσου , έχουν φέρει θετικά αποτελέσματα που υποστηρίζουν την χρήση της ως βιοδείκτη της NAFLD .

Ο σκοπός μας είναι να εκτιμήσουμε τα επίπεδα της IL 6 στην απλή στεάτωση SS με γνώμονα ότι η παχυσαρκία θεωρείται πλέον χρόνια φλεγμονώδης κατάσταση και είναι βέβαια ένα από τα βασικά γνωρίσματα ασθενών με μη αλκοολική λιπώδη διήθηση .

Προσδιορισμός αποτελεσμάτων

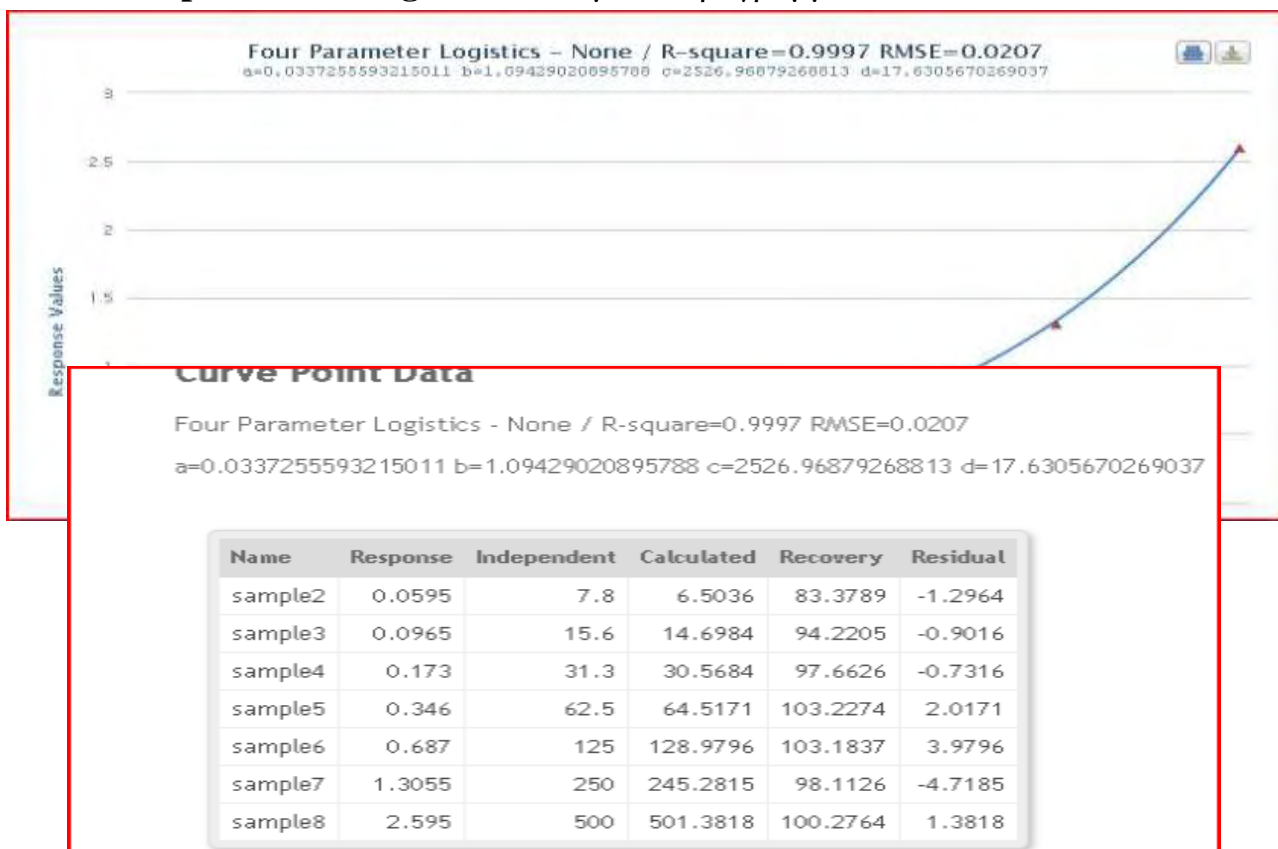
Η μέτρηση των επιπέδων ιντερλευκίνης 6 έγινε με ανοσοενζυμική μέθοδος ELISA. Χρησιμοποιήθηκαν οροί αίματος από 176 εθελοντές από τους οποίους οι 88 έχουν διαγνωστεί με μη αλκοολικής λιπώδη διήθηση και οι υπόλοιποι 88 όχι .

Εντός 30 λεπτών από το τέλος της δοκιμασίας Elisa , κάναμε μέτρηση της οπτικής απορρόφησης στα 450 nm .Έγινε συσχέτιση της οπτικής απορρόφησης των προτύπων (14 , 7 για κάθε πλακίδιο) και δημιουργήθηκε η πρότυπη καμπύλη που μετέπειτα μας βοήθησε να ορίσουμε τις συγκεντρώσεις κάθε δείγματος .

				OD-OD(S0)	CON
S0	0,099	0,099	0,099	0	0
S1	0,156	0,161	0,1585	0,0595	7,8
S2	0,188	0,203	0,1955	0,0965	15,6
S3	0,269	0,275	0,272	0,173	31,3
S4	0,459	0,431	0,445	0,346	62,5
S5	0,782	0,79	0,786	0,687	125
S6	1,403	1,406	1,4045	1,3055	250
S7	2,666	2,722	2,694	2,595	500
$x = C * (((A-D)/(F(x)-D)) - 1)^{(1/B)}$					

Εικόνα : Στην εικόνα βλέπουμε τα πρότυπα s0 έως s7 ανάλογα με την περιεκτικότητα τους σε IL6 από μηδέν τα s0 έως 500pg τα s7 , τις απορροφήσεις των προτύπων .(7 + 7 στις στήλες με τις τονισμένες γραμμές) και δίπλα βλέπουμε τον μέσο όρο απορρόφησης .Από αυτό γίνεται αφαίρεση της απορρόφησης (0,099) που εμφανίζεται στο τυφλό .

Εικόνα : 4 parameter Logistic curve με το πρόγραμμα reader fit .



Στα αποτελέσματα συμπεριλάβαμε μετρήσεις εντός ενός αποδεκτού όριου εως $\pm 2SD$. Μετρήσεις πέρα από αυτό απορρίφθηκαν .

.Ο μέσος όρος της ιντερλευκίνης 6 στους ασθενείς ήταν μεγαλύτερος από ότι στους υγιείς. Αλλά η διαφορά δεν ήταν τόσο σημαντική $P=0,0191$
 Λάβαμε ακραίες τιμές και στις δύο περιπτώσεις που στατιστικά διορθώθηκαν .

	IL 6 (pg/ml)
NAFLD	$21,87 \pm 10,5$
No NAFLD	$17,85 \pm 12,0$
Significance Level	$P=0,0191$

Μέση τιμή σε pg/ml της IL6 σε control και cases .

Εκτίμηση αποτελεσμάτων

Από τα αποτελέσματα που λάβαμε γίνεται σαφές ότι η ιντερλευκίνη 6 δεν αποτελεί **ανεξάρτητα δείκτη** για την διάγνωση της στεάτωσης .Τα επίπεδα της βρέθηκαν υψηλά τόσο στους ορούς και τον ασθενών όσο και των υγιών.

Η μέση τιμή των ασθενών βρέθηκε να είναι μεγαλύτερη από των υγιών , παρόλα αυτά διαγνωστικά δεν φαίνεται να έχει κάποια αξία , μιας και λάβαμε σε πάρα πολλές περιπτώσεις ίδια επίπεδα στους υγιείς με τους ασθενείς και σε πολλές περιπτώσεις και μεγαλύτερα ακόμα και μετά από την στατιστική διόρθωση .

Τα αποτελέσματα αυτά εκτιμάτε ότι λήφθηκαν λόγω του πολυδιάστατου ρόλου που έχει και η μεσολάβησή της και σε πολλές άλλες βιολογικές καταστάσεις.

Ωστόσο η **διαγνωστική αξία της IL 6 φαίνεται να εξαρτάται και από άλλους παράγοντες** .Για το λόγο αυτό επιχειρήθηκε η **σύγκριση των επιπέδων** της σε **συνδυασμό** με κοινά χαρακτηριστικά των ασθενών με λιπώδη διήθηση .

Σε μια προσπάθεια **συσχέτισης των επιπέδων** της IL 6 με την νόσο βρέθηκε ότι ασθενείς με στεάτωση τείνουν να έχουν **$BMI >28\text{kg/m}^2$, $\text{τριγλυκερίδια} > 100$ και $IL6 > 14\text{pg/ml}$** .

Η ύπαρξη αυτής της συσχέτισης οδήγησε στην μελέτη της τυχόν ύπαρξης διαγνωστικής αξίας των επιπέδων της IL 6 συνδυασμό με το BMI και τα TG s .

Μεθοδολογία

Έγινε τυχαία διαλογή 20 ασθενών και 20 υγιών ατόμων .(σύνολο 40)

Ελέγχθηκε η διαγνωστική αξία του $BMI \geq 28 \text{ kg/m}^2$, $Tgs \geq 100$, $IL 6 \geq 14\text{pg/ml}$.

Η δοκιμή επαναλήφθηκε και έγινε έλεγχος ξανά.

Στην πρώτη δοκιμή από τους 20 ασθενείς κατάφερε να διαγνώσει τους 17 , ενώ από

τους 20 υγιείς διέγνωσε σωστά τους 18 .

$$\begin{array}{r} \text{Ευαισθησία} \quad 17 \\ \hline 20 \end{array} \times 100 = 85 \quad \text{Ευαισθησία } 85 \%$$

$$\begin{array}{r} \text{εξειδίκευση} \quad 18 \\ \hline 20 \end{array} \times 100 = \quad \text{εξειδίκευση } 90 \%$$

Η επανάληψη που έγινε (**20 control 40 cases**),διέγνωσε **34** από τους 40 ασθενείς ευαισθησία **85%** και **19** από τους 20 υγιείς εξειδίκευση **95 %** .Τα αποτελέσματα όμως μένουν να ερευνηθούν περαιτέρω .

Συμπεράσματα

Η ίδια η φύση της νόσου αλλά και τα μεμονωμένα παθολογικά προφίλ του κάθε ασθενή , κρίνουν την χρήση ανεξάρτητων δεικτών της SS της NAFLD ανεπαρκή .

Από πλευράς βιοχημικών αναλύσεων , δεν υπάρχει κάποιο εργαστηριακό εύρημα που να καθίσταται ικανό στην πρόγνωση με ασφάλεια της νόσου .

Η χρήση των ηπατικών ενζύμων δεν είναι ικανός βιοδείκτης στεάτωσης μιας και στο 70% των περιπτώσεων τα επίπεδά τους κυμαίνονται στα φυσιολογικά .

Στα επίπεδα των περισσότερων δεικτών ηπατικής βλάβης λάβαμε έναν μέσο όρο στους ασθενείς μεγαλύτερο από τους υγιείς , αλλά πάντα μέσα στα όρια του φυσιολογικού .Το ίδιο αποτέλεσμα πήραμε και στους δείκτες φλεγμονής όπως και στα επίπεδα σιδήρου .

Συμπερασματικά , για την διάγνωση της μη αλκοολικής ηπατικής στεάτωσης , με μη επεμβατική μέθοδο εκτός του υπερηχογραφήματος , χρήσιμο εργαλείο βρέθηκε να είναι η συνδυαστική χρήση του δείκτη μάζας σώματος , μαζί με το επίπεδο των τριγλυκεριδίων και την ιντερλευκίνης 6 .Η μελέτη μας έδειξε ότι χρήση των 3 αυτών δεικτών , παρέχει ικανοποιητική ευαισθησία και εξειδίκευση στην διάγνωση της νόσου .

Συζήτηση

Ο τομέας των μη επεμβατικών δεικτών της μη αλκοολικής λιπώδη νόσου είναι ευρύς. Διεξάγεται πλήθος μελετών , κάθε μία χρησιμοποιώντας διαφορετικές τεχνικές προσθέτοντας έτσι περαιτέρω ετερογένεια στο πεδίο .

Κάθε μία τεχνική απευθύνεται σε διαφορετικό προφίλ ασθενών ,με διαφορετικό στάδιο της νόσου και έχει άλλη στρατηγική προσέγγισης .Για το λόγο αυτό είναι δύσκολη η σύγκριση των τεχνικών αυτών μεταξύ τους .

Η ετερογένεια αυτή των μεθόδων και των τεχνικών , αντικατοπτρίζει την ίδια την νόσο .

Η παθογένεια της παραμένει δεν έχει πλήρως διαλευκανθεί και σε πολλά σημεία παραμένει άγνωστη .Ένα βασικό γνώρισμα είναι η λανθασμένη μεταφορά και μεταβολισμός του λίπους,η ανθεκτικότητα στην ινσουλίνη, το οξειδωτικό στρες και η φλεγμονή αν και η ακριβής επικοινωνία αυτών των πολύπλοκων μονοπατιών που επιφέρουν την νόσο είναι άγνωστη .Άγνωστη είναι ακόμα και η ακριβής σχέση μεταξύ της SS και της NASH αν και είναι σχεδόν σίγουρο ότι η δεύτερη είναι επακόλουθο της πρώτης , χωρίς να σημαίνει βέβαια ότι όσοι έχουν ηπατική στεάτωση θα αναπτύξουν και στεατοηπατίτιδα.

Η ανακάλυψη και επικύρωση βιοδεικτών για τη NAFLD έχει πολλά δυνητικά οφέλη, συμπεριλαμβανομένης της αυξημένης ευκολία στην διάγνωση, τον μειωμένο κίνδυνο,το μειωμένο κόστος, καθώς και τις γνώσεις που λαμβάνουμε από τις τεχνικές που χρησιμοποιούνται για τους μηχανισμούς της νόσου και την παθογένεση της που μας είναι ακόμα άγνωστοι. Επιπροσθέτως, οι δείκτες που θα μπορούν να διαγνώσουν με ακρίβεια και να χαρακτηρίσουν την NAFLD θα βοηθήσουν στο να εστιάσουν οι θεραπευτικές τακτικές .Είναι σαφές ότι οι βιοδείκτες οι ίδιοι και τα μονοπάτια τους τις περισσότερες φορές γίνονται ένας καλός θεραπευτικός στόχος .

Οι πρωτεομικές και γονιδωματικές μελέτες παρέχουν λύσεις στον γρίφο των μηχανισμών και της παθογένεσης της νόσου και δεν παύουν να παρουσιάζουν και πιθανούς στόχους για εύρεση μη επεμβατικών βιοδεικτών .Αν και αυτές οι μελέτες απαιτούν να γίνουν σε μεγαλύτερη κλίμακα ώστε να επικυρωθούν τα ευρήματά τους.

Περισσότερη κλινική χρησιμότητα δείχνουν να έχουν οι βιοδείκτες που προέρχονται από μελέτες συσχέτισης αλλά και οι μελέτες με χρήση αλγόριθμων .Αποτελούνται κυρίως από κλινικά εύκολα διαθέσιμους βιοδείκτες έχοντας έτσι την δυνατότητα να χρησιμοποιηθούν στην καθημερινή πρακτική .

Πολλά από τα συστήματα αλγόριθμων έχουν χρησιμοποιηθεί και έχουν

αξιολογηθεί σε μεγάλους πληθυσμούς (BARD , nafld fibrosis score) με ενθαρρυντικά αποτελέσματα .Είναι σαφές ότι ένας αριθμός αυτών των συστημάτων έχει πιθανή κλινική χρησιμότητα αν και ο ακριβής ρόλος των συστημάτων βαθμονόμησης παραμένει ασαφής .

Μένει λοιπόν να δούμε αν με την εξέλιξη όλων αυτών των βιοδεικτών που προέρχονται από διαφορετικές προσεγγίσεις θα καταστεί ποτέ δυνατόν να εξαλειφθεί η ανάγκη για βιοψία , αν ποτέ κάποιος δείκτης ή συνδυασμός τους θα καταφέρει να την αντικαταστήσει ή αν τελικά όλοι αυτοί οι δείκτες χρησιμεύουν στο να κατευθύνουν όσοι πραγματικά είναι σε κίνδυνο , στην βιοψία ήπατος .

• **BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

“Οι αριθμημένες παραπομπές αντιστοιχούν σε μελέτες των οποίων τα αποτελέσματα χρησιμοποιήθηκαν αυτούσια εντός του κειμένου”

[1]Serum gamma-glutamyltranspeptidase distinguishes non-alcoholic fatty liver disease at high risk.

Tahan V1,Canbakan B,Balci H,Dane F,Akin H,Can G,Hatemi I,Olgac V,Sonsuz A,Ozbay G,Yurdakul I,Senturk H.

[2]Pathways underlying iron accumulation in human nonalcoholic fatty liver disease
Elmar Aigner,Igor Theurl,Milan Theurl,Dieter Lederer,Heike Haufe,Otto Dietze,Michael Strasser,Christian Datz, aGuenther Weiss

[3]A NOVEL PATHOPHYSIOLOGICAL-BASED PANEL OF BIOMARKERS FOR THE DIAGNOSIS OF NONALCOHOLIC STEATOHEPATITIS

M. GRIGORESCU, D. CRISAN, C. RADU, M.D. GRIGORESCU, Z. SPARCHEZ, A. SERBAN

[4]Interleukin-10 to tumor necrosis factor-alpha ratio is a predictive biomarker in nonalcoholic fatty liver disease: interleukin-10 to tumor necrosis factor-alpha ratio in

steatohepatitis

Hashem, Reem M.a; Mahmoud, Mona F.b; EL-Moselhy, Mohamed A.c; Soliman, Hala M.d

[5]TNF- α messenger ribonucleic acid (mRNA) in patients with nonalcoholic steatohepatitis.

nada alaedine et al.

[6]Serum levels of CK18 M30 and leptin are useful predictors of steatohepatitis and fibrosis in paediatric NAFLD.

Fitzpatrick EI,Mitry RR,Quaglia A,Hussain MJ,DeBruyne R,Dhawan A.

[7]SERUM LEVELS OF LEPTIN AND ADIPONECTIN IN PATIENTS WITH NONALCOHOLIC FATTY LIVER DISEASE: POTENTIAL BIOMARKERS

Madiha MEI-Attar and Nagla TE-Melegy

[8]The association between adipocytokines and biomarkers for nonalcoholic fatty liver disease-induced liver injury: a study in the general population

Zelber-Sagi, Shiraa,b; Ratziu, Vlade; Zvibel, Izabela,d; Goldiner, Ilanaa,d; Blendis, Lauriea; Morali, Gillese; Halpern, Zamira,d; Oren, Rana,

[9]Serum adipokine levels in overweight patients and their relationship with non-alcoholic fatty liver disease.

Abenavoli L1Luigiano C,Guzzi PH,Milic N,Morace C,Stelitano L,Consolo P,Miraglia S,Fagoonee S,Virgilio C,Luzza F,De Lorenzo A,Pellicano R.

[10]Apoptosis in nonalcoholic fatty liver disease: diagnostic and therapeutic implications

Naim Alkhouri, Christine Carter-Kent, and Ariel E Feldstein

[11]Serum cytokeratin-18 fragment levels are useful biomarkers for nonalcoholic steatohepatitis in children.

Feldstein AE1,Alkhouri N,De Vito R,Alisi A,Lopez R,Nobili V.

[12]CK-18 levels inadequate as stand-alone NASH, fibrosis test

Cusi K.J Hepatol. 2013;doi:10.1016/j.jhep.2013.07.042.

[13]C-reactive protein levels in relation to various features of non-alcoholic fatty liver disease among obese patients

Esther Zimmermann^{1,2}, Rodolphe Anty^{3,4,5}, Joan Tordjman^{6,7,8}, An Verrijken⁹, Philippe Gual^{3,4,5}, Albert Tran^{3,4,5}, Antonio Iannelli^{3,4,5}, Jean Gugenheim^{3,4,5}, Pierre Bedossa^{10,11}, Sven Francque¹², Yannick Le Marchand-Brustel^{3,4,5}, Karine Clement

[14]Performance of Biomarkers FibroTest, ActiTest, SteatoTest, and NashTest in Patients with Severe Obesity: Meta Analysis of Individual Patient DataThierry

Poynard mail,Guillaume Lassailly,Emmanuel Diaz,Karine Clement,Robert Caiazzo,Joan TordjmaMona Munteanu,Hugo Perazzo,

[15]Chalasani N, Deeg MA, Crabb DW. Systemic levels of lipid peroxidation and its metabolic and dietary correlates in patients with nonalcoholic steatohepatitis. Am J Gastroenterol 2004; 99: 1497–502.

[16]Videla LA, Rodrigo RN, Orellana M, et al. Oxidative stressrelated

parameters in the liver of non-alcoholic fatty liver disease patients. Clin Sci 2004; 106: 261–8.

[17] Saricam T, Kircali B, Koken T. Assessment of lipid peroxidation and antioxidant capacity in non-alcoholic fatty

- A.J., L.A. Adams, and J.R. Burnett, *Genetic determinants of hepatic steatosis in man*. J Lipid Res, 2011. **52**(4): p. 593-617.
- Wagenknecht, L.E., et al., *Correlates and heritability of nonalcoholic fatty liver disease in a minority cohort*. Obesity (Silver Spring), 2009. **17**(6): p. 1240-6.
- . Schwimmer, J.B., et al., *Heritability of nonalcoholic fatty liver disease*. Gastroenterology, 2009. **136**(5): p. 1585-92.
- . Marchesini, G., et al., *Association of nonalcoholic fatty liver disease with insulin resistance*. Am J Med, 1999. **107**(5): p. 450-5.
- . Sanyal, A.J., et al., *Nonalcoholic steatohepatitis: association of insulin resistance and mitochondrial abnormalities*. Gastroenterology, 2001. **120**(5): p. 1183-92.
- . Lieber, C.S., et al., *Model of nonalcoholic steatohepatitis*. Am J Clin Nutr, 2004. **79**(3): p. 502-9. Deng, Q.G., et al., *Steatohepatitis induced by intragastric overfeeding in mice*. Hepatology, 2005. (4): p. 905-14.
- Sahai, A., et al., *Obese and diabetic db/db mice develop marked liver fibrosis in a model of nonalcoholic steatohepatitis: role of short-form leptin receptors and osteopontin*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2004. **287**(5): p. G1035-43.
- Bellentani, S., et al., *Prevalence of and risk factors for hepatic steatosis in Northern Italy*. Ann Intern Med, 2000. **132**(2): p. 112-7.
- Hamaguchi, M., et al., *The metabolic syndrome as a predictor of nonalcoholic fatty liver disease*. Ann Intern Med, 2005. **143**(10): p. 722-8.
- . Wang, Y., et al., *Association between metabolic syndrome and the development of non-alcoholic fatty*
- *Speeckaert, M., et al., Biological and clinical aspects of the vitamin D binding protein (Gc-globulin) and its polymorphism*. Clin Chim Acta, 2006. **372**(1-2): p. 33-42.
- Delanote, V., J. Vandekerckhove, and J. Gettemans, *Plastins: versatile modulators of actin organization in (patho)physiological cellular processes*. Acta Pharmacol Sin, 2005. **26**(7): p. 769-79.
- Targher, G., et al., *Associations between serum 25-hydroxyvitamin D3 concentrations and liver histology in patients with non-alcoholic fatty liver disease*. Nutr Metab Cardiovasc Dis, 2007. **17**(7): p. 517-24. Takiishi, T., et al., *Vitamin D and diabetes*. Endocrinol Metab Clin North Am, 2010. **39**(2): p. 419-46, table of contents.

- Luo, W., et al., *Identification of polymorphisms associated with hypertriglyceridemia and prolonged survival induced by bexarotene in treating non-small cell lung cancer*. Anticancer Res, 2011. **31**(6): p. 2303-11.
- Kaser, S., et al., *Adiponectin and its receptors in non-alcoholic steatohepatitis*. Gut, 2005. **54**(1): p. 117-21.
- Musso, G., et al., *Adiponectin gene polymorphisms modulate acute adiponectin response to dietary fat: Possible pathogenetic role in NASH*. Hepatology, 2008. **47**(4): p. 1167-77.
- .Wong, V.W., et al., *Genetic polymorphisms of adiponectin and tumor necrosis factor-alpha and nonalcoholic fatty liver disease in Chinese people*. J Gastroenterol Hepatol, 2008. **23**(6): p. 914-21. Bugianesi E, Manzini P, D'Antico S, et al. Relative contribution of iron burden, HFE mutations and insulin resistance to fibrosis in non-alcoholic fatty liver. Hepatology 2004; 39: 179-187.
- Itoh S, Yougel, Kawagoe K. Comparison between nonalcoholic steatohepatitis and alcoholic hepatitis. Am J Gastroenterol 1987; 82: 650-654.
- Cortez-Pinto H, Baptista A, Camilo ME, Valente A, Saragoca A, DeMoura MC: Nonalcoholic steatohepatitis clinicopathological comparison with alcoholic hepatitis ambulatory and hospitalized patients. Dig Dis Sci 1996;
- . Abrams GA, Jhala N, Lazenby AJ, et al. Comparison of paired liver biopsies in morbidly obese subjects with nonalcoholic fatty liver disease. Gastroenterology 2004; 126: Ratzliff V, Charlotte F, Heurtier A, et al. High sampling variability of percutaneous liver biopsy in non-alcoholic fatty liver disease. Hepatology 2004; 40: 237A Promrat K, Lutchman G, Uwaifo GI, et al. A pilot study of pioglitazone treatment for non-alcoholic steatohepatitis. Hepatology 2004; 39: 188-191 Newschwander-Tetri BA, Brunt EM, Wehmeier KR, Oliver
- Dr, Bacon BR. Improvement in nonalcoholic steatohepatitis following 48 weeks of treatment with the PPAR-gamma ligand rosiglitazone. Hepatology 2003; 38: 1008-1017. Lindor KD, Kowdley KV, Heathcote EJ, et al. Ursodeoxycholic acid for treatment of nonalcoholic steatohepatitis: results of a randomized trial. Hepatology 2004; 39: 770